

SÉRIE A,  
N° D'ORDRE :  
615

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Pierre DUPUY

1<sup>re</sup> THÈSE

L'INHIBITION PAR L'ACIDE SULFUREUX  
DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL  
PAR ACETOBACTER RANCENS

2<sup>e</sup> THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

, devant la Commission d'Examen :

M. E. LEDERER *Président.*

M<sup>me</sup> P. CHAIX  
M. G. CAMUS } *Examineurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
149 Rue de Grenelle - Paris-VII







# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

**Pierre DUPUY**

1<sup>re</sup> THÈSE

L'INHIBITION PAR L'ACIDE SULFUREUX  
DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL  
PAR ACETOBACTER RANCENS

2<sup>e</sup> THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

, devant la Commission d'Examen :

M. E. LEDERER *Président.*

M<sup>me</sup> P. CHAIX }

M. G. CAMUS }

*Examineurs.*



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149 Rue de Grenelle - Paris-VII



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

## PROFESSEURS

Doyen ..... J. PÉRÈS

|                                 |   |                                             |                                  |   |                                              |
|---------------------------------|---|---------------------------------------------|----------------------------------|---|----------------------------------------------|
| G. JULIA .....                  | T | Analyse supérieure et Algèbre supérieure.   | TRILLAT .....                    | T | Microscopie et diffraction électronique.     |
| FOCH .....                      | T | Mécanique physique et expérimentale.        | WIEMANN .....                    | T | Chimie organique et structurale.             |
| De BROGLIE .....                | T | Théories physiques.                         | JACQUINOT .....                  | T | Spectroscopie et Physique céleste.           |
| PRENANT .....                   | T | Anatomie et Histologie comparées.           | VASSY .....                      | T | Physique de l'atmosphère.                    |
| PÉRÈS .....                     | T | Mécanique des fluides et applications.      | DESTOUCHES .....                 | T | Théories physiques.                          |
| M. CURIE .....                  | T | Physique (S. P. C. N.).                     | M. PRUVOST .....                 | T | Géologie.                                    |
| BARRABÉ .....                   | T | Géologie structurale et Géologie appliquée. | AMIEL .....                      | T | Chimie générale (P. C. B.).                  |
| J. BOURCART .....               | T | Géographie physique et Géologie dynamique.  | HOCART .....                     | T | Minéralogie.                                 |
| PLANTEFOL .....                 | T | Botanique.                                  | J.-P. MATHIEU .....              | T | Physique (P. C. B.).                         |
| GRASSÉ .....                    | T | Evolution des êtres organisés.              | COUTEAUX .....                   | T | Biologie animale (P. C. B.).                 |
| PRÉVOST .....                   | T | Chimie organique.                           | MAY .....                        | T | Biologie animale (P. C. B.).                 |
| BOULIGAND .....                 | T | Application de l'analyse à la Géométrie.    | CHOQUET .....                    | T | Calcul différentiel et intégral.             |
| CHAUDRON .....                  | T | Chimie appliquée.                           | FELDMANN .....                   | T | Biologie (P. C. B.).                         |
| WYART .....                     | T | Minéralogie.                                | GUINIER .....                    | T | Physique des solides.                        |
| TEISSIER .....                  | T | Zoologie.                                   | JOST .....                       | T | Physiologie comparée.                        |
| MANGENOT .....                  | T | Biologie végétale.                          | FORTET .....                     | T | Calcul des probabilités.                     |
| P. AUGER .....                  | T | Physique quantique et Relativité.           | SCHWARTZ .....                   | T | Calcul différentiel et intégral.             |
| MONNIER .....                   | T | Physiologie générale.                       | CHOUARD .....                    | T | Physiologie végétale.                        |
| PIVETEAU .....                  | T | Paléontologie.                              | MALAVARD .....                   | T | Aviation.                                    |
| ROCARD .....                    | T | Physique (E. N. S.).                        | BRELOT .....                     | T | Calcul différentiel.                         |
| H. CARTAN .....                 | T | Mathématiques (E. N. S.).                   | NORMANT .....                    | T | Chimie organique.                            |
| LAFITTE .....                   | T | Chimie générale.                            | BÉNARD .....                     | T | Chimie minérale.                             |
| FAVARD .....                    | T | Géométrie supérieure.                       | BUVAT .....                      | T | Botanique (E. N. S.).                        |
| COULOMB .....                   | T | Physique du Globe.                          | DUGUE .....                      | T | Statistiques mathématiques.                  |
| M <sup>lle</sup> COUSIN .....   | T | Biologie animale (S. P. C. N.).             | GELOSO .....                     | T | Chimie (S. P. C. N.).                        |
| CHRÉTIEN .....                  | T | Chimie minérale.                            | SOULAIRAC .....                  | T | Psychophysiologie.                           |
| P. DRACH .....                  | T | Zoologie.                                   | ULRICH .....                     | T | Physiologie végétale.                        |
| KASTLER .....                   | T | Physique (E. N. S.).                        | MARÉCHAL .....                   | T | Optique théorique et appliquée.              |
| EPHRUSSI .....                  | T | Génétique.                                  | KIRRMANN .....                   | T | Théories chimiques.                          |
| WURMSER .....                   | T | Biologie physico-chimique.                  | CHADEFAUD .....                  | T | Botanique.                                   |
| RIVIÈRE .....                   | T | Géologie (S. P. C. N.).                     | DESTRIAU .....                   | T | Physique (M. P. C.).                         |
| GAUTHERET .....                 | T | Biologie végétale (P. C. B.).               | M <sup>lle</sup> LE BRETON ..... | T | Physiologie générale.                        |
| LUCAS .....                     | T | Recherches physiques.                       | SALEM .....                      | T | Mathématiques générales.                     |
| A. THOMAS .....                 | T | Biologie cellulaire.                        | LELONG .....                     | T | Mathématiques générales.                     |
| ARNULF .....                    | T | Optique appliquée.                          | DEVILLERS .....                  | T | Anatomie et Histologie comparées.            |
| M. MORAND .....                 | T | Enseignement de Physique.                   | EHRESMANN .....                  | T | Topologie algébrique.                        |
| SOLEILLET .....                 | T | Physique.                                   | FRANÇON .....                    | T | Physique (S. P. C. N.).                      |
| FORTIER .....                   | T | Mécanique expérimentale des fluides.        | GLANGEAUD .....                  | T | Géographie physique et Géologie dynamique.   |
| DANJON .....                    | T | Astronomie.                                 | GODEMENT .....                   | T | Mathématiques (M. P. C.).                    |
| LAPORTE .....                   | T | Physique générale et Radioactivité.         | PISOT .....                      | T | Calcul des probabilités.                     |
| JANET .....                     | T | Mécanique analytique et Mécanique céleste.  | E. ROCH .....                    | T | Géologie.                                    |
| PETIT .....                     | T | Biologie maritime.                          | SCHATZMANN .....                 | T | Astrophysique.                               |
| QUENEY .....                    | T | Météorologie et dynamique atmosphérique.    | TERMIER .....                    | T | Paléontologie stratigraphique.               |
| GALLIEN .....                   | T | Embryologie.                                | ZAMANSKY .....                   | T | Mathématiques générales.                     |
| EICHORN .....                   | T | Biologie végétale (S. P. C. N.).            | LENNUIER .....                   | T | Physique (M. G. P.).                         |
| De CUGNAC .....                 | T | Biologie végétale (S. P. C. N.).            | RIZET .....                      | T | Génétique.                                   |
| M <sup>lle</sup> CAUCHOIS ..... | T | Chimie physique.                            | ROUTHIER .....                   | T | Géologie appliquée.                          |
| THELLIER .....                  | T | Physique du Globe.                          | M <sup>me</sup> TONNELAT .....   | T | Physique théorique.                          |
| L'HÉRITIER .....                | T | Génétique.                                  | DIXMIER .....                    | T | Mathématiques (M. P. C.).                    |
| GRIVET .....                    | T | Radioélectricité.                           | SOUCHAY .....                    | T | Chimie générale.                             |
| PONCIN .....                    | T | Mécanique générale.                         | AIGRAIN .....                    | T | Électrotechnique.                            |
| DUBREIL .....                   | T | Arithmétique et théorie des nombres.        | BRUSSET .....                    | T | Chimie générale.                             |
| QUELET .....                    | T | Chimie organique.                           | M. LEVY .....                    | T | Physique théorique.                          |
| CAGNIARD .....                  | T | Géophysique appliquée.                      | M <sup>me</sup> CHAIX .....      | T | Chimie biologique.                           |
| CHAMPETIER .....                | T | Chimie macromoléculaire.                    | M <sup>me</sup> HUREL-PY .....   | T | Biologie végétale (P. C. B.).                |
| CUVILLIER .....                 | T | Géologie structurale et Géologie appliquée. | PIAUX .....                      | T | Chimie (P. C. B.).                           |
| JUNG .....                      | T | Pétrographie.                               | BRUN .....                       | T | Mécanique expérimentale des fluides.         |
|                                 |   |                                             | LEDERER .....                    | T | Chimie des substances organiques naturelles. |
|                                 |   |                                             | M <sup>me</sup> DUBREIL .....    | T | Mathématiques.                               |
|                                 |   |                                             | M <sup>me</sup> LELONG .....     | T | Mathématiques (E. N. S.).                    |
|                                 |   |                                             | BELLAIR .....                    | T | Géologie (S. P. C. N.).                      |
|                                 |   |                                             | COTTE .....                      | T | Physique (M. P. C.).                         |
|                                 |   |                                             | DUBOIS J. E. ....                | T | Chimie (S. P. C. N.).                        |
|                                 |   |                                             | LAMOTTE .....                    | T | Zoologie (E. N. S.).                         |
|                                 |   |                                             | LE ROLLAND .....                 | T | Mécanique des fluides.                       |
|                                 |   |                                             | MICHEL André .....               | T | Chimie (S. P. C. N.).                        |

|                 |   |                                           |                              |                                                   |
|-----------------|---|-------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------|
| OLMER .....     | T | Énergétique Générale.                     | TONNELAT.....                | Biol. physicochimique.                            |
| ROUAULT.....    | T | Physique Générale.                        | VILLE.....                   | Econométrie.                                      |
| GAUTHIER.....   | T | Méc. appliquée.                           | WILLEMART.....               | Chimie (P. C. B.).                                |
| BARCHEWITZ..... |   | Chimie Physique.                          | DODÉ.....                    | T Chimie.                                         |
| BROSSEL .....   |   | Physique atomique.                        | FREYMANN.....                | T Physique (S. P. C. N.)                          |
| BUSER .....     |   | Biologie animale (P. C. B.).              | GUINOCHE.....                | T Biol. Vég. (Orsay).                             |
| GAMUS .....     |   | Biol. Vég. (P. C. B.).                    | ROLLET .....                 | T Chimie (P. C. B.).                              |
| GASTAING .....  |   | Physique générale.                        | M <sup>lle</sup> JOSIEN..... | T Chimie (P. C. B.).                              |
| CURIEN .....    |   | Minéralogie et cristallogra-<br>phie.     | CHEVALLEY.....               | T Géométrie algébrique et<br>théorie des groupes. |
| MOYSE.....      |   | Physiologie végétale.                     | ARNOULT.....                 | T Physique (Orsay).                               |
| NOIROT .....    |   | Évolution des êtres organisés.            | CHAPELLE.....                | T Physique (Orsay).                               |
| PANNETIER.....  |   | Chimie (S. P. C. N.).                     | DELANGE .....                | T Mathématiques (Orsay).                          |
| POSSOMPES.....  |   | Biologie Animale (P. C. B.).              | DENY.....                    | T Mathématiques (Orsay).                          |
| PULLMANN.....   |   | Chimie théorique.                         | GERMAIN P.....               | T Méc. théor. des fluides.                        |
| TEILLAC.....    |   | Physique nucléaire et radio-<br>activité. | LUCAS G.....                 | T Géologie.                                       |

Secrétaire Général..... CH. MONIER

L'INHIBITION PAR L'ACIDE SULFUREUX  
DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL  
PAR ACETOBACTER RANCENS



A MES PARENTS

*En témoignage de ma gratitude*



Au moment où nous terminons ce travail, qu'il nous soit permis d'évoquer avec tristesse la mémoire de Monsieur le Professeur C. FROMAGEOT. Il nous a aidé à délimiter le sujet de cette étude, il nous a largement fait profiter de ses connaissances, et il a suivi pas à pas nos réalisations expérimentales. Ses critiques et ses encouragements nous ont guidé dans cette étude. Trop tôt disparu pour juger nos résultats, nous voulons lui rendre ici un hommage ému et reconnaissant.

Madame le Professeur P. CHAIX a bien voulu s'intéresser à notre travail après la disparition de Monsieur le Professeur C. FROMAGEOT, ses conseils nous ont été précieux et nous ont ouvert des perspectives nouvelles pour l'étude des cytochromes des bactéries acétiques ; nous la remercions vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur E. LEDERER nous a fait l'honneur de présider le jury et nous lui en exprimons toute notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. CAMUS a bien voulu être notre examinateur et nous proposer le sujet de notre deuxième thèse, nous l'en remercions très sincèrement.

Que Monsieur le Professeur M. LEMOIGNE, Membre de l'Institut, veuille bien accepter l'hommage de notre gratitude ; c'est auprès de lui et de ses collaborateurs, que nous avons appris les techniques de la microbiologie et de la biochimie, c'est dans son laboratoire que nous avons réalisé une partie de nos expériences.

C'est avec joie que nous adressons nos remerciements à Monsieur H. FERRU, Directeur de l'Institut National de la Recherche Agronomique, à Monsieur l'Inspecteur Général J. BUSTARRET, à Monsieur M. FLANZY, Directeur central de recherches, et à Monsieur A. BARRET, Directeur de recherches, ils nous ont fait confiance pour réaliser ce travail, et ils ont bien voulu nous accorder les moyens nécessaires pour le mener à bon terme.



## INTRODUCTION

L'anhydride sulfureux, ses solutions ou les sels qui en dérivent sont parmi les antiseptiques et les inhibiteurs les plus anciennement utilisés. L'emploi de l'anhydride sulfureux remonte au moins à la civilisation romaine et peut-être égyptienne, où il servait à l'assainissement des vases vinaires. Bien que nous disposions à présent de très nombreux antiseptiques et inhibiteurs, on continue à en faire un large usage, chaque fois qu'on peut l'employer en milieu acide. On sait en effet, depuis longtemps, que les sulfites sont d'autant plus actifs que le milieu est plus acide.

Plusieurs avantages expliquent que l'anhydride sulfureux soit encore préféré à des moyens plus modernes. C'est le seul antiseptique qui puisse se prévaloir d'un usage aussi long, et vingt siècles d'emploi constant en œnologie n'ont laissé le souvenir d'aucun effet dévaforable sur le consommateur. Il est donc normal que quelques publications faisant état d'une faible action toxique à haute dose n'aient rien changé à son emploi (2). D'autres composés se sont aussi montré dépourvus de toxicité dans des expériences de laboratoire, mais étant d'invention beaucoup plus récente, il leur manque encore cette consécration de l'usage. Du point de vue physiologique, il est rassurant de savoir que le sulfite peut être métabolisé par les animaux supérieurs (65) (31). A côté de son innocuité, il possède aussi une autre propriété très avantageuse, c'est sa volatilité. Il est donc possible de l'éliminer des produits alimentaires lorsqu'il y est devenu inutile et cela facilite grandement son emploi du point de vue technologique.

Actuellement, l'anhydride sulfureux liquéfié ou en solution, le sulfite de sodium et le métabisulfite de potassium, sont largement employés dans les industries utilisant des processus biologiques. Ils sont utilisés pour la conservation des jus de fruits à cause de leur pouvoir antiseptique et comme inhibiteurs de la polyphenol oxydase et des réactions de brunissement provoquées soit par des enzymes, soit par des réactions chimiques non enzymatiques.

En œnologie et en cidrerie, ils contribuent à la sélection des micro-organismes utiles, qui sont moins sensibles à leur action que les germes provoquant des altérations. Ils assurent ensuite la conservation des produits élaborés et particulièrement de ceux qui, à cause du sucre qu'ils contiennent, ne présentent pas une résistance suffisante au développement des levures ou des lactobacilles. Dans la préparation des ensilages, on a

constaté récemment, qu'une dose de 4 grammes de métabisulfite de sodium par kilo., suffit à empêcher la fermentation butyrique et la dégradation des substances azotées. Dans cette application, il se révèle comme antiseptique très efficace, particulièrement bon marché et tout à fait inoffensif pour les ruminants qui possèdent une flore intestinale capable de le métaboliser. Pour la conservation des fruits et légumes, ils servent à préparer les solutions où se fait le stockage avant de les transformer en confiture ou en purée. Les fruits desséchés subissent aussi habituellement un traitement à l'anhydride sulfureux. La viande et le poisson sont aussi susceptibles d'être traités par ce procédé, afin d'en faciliter la conservation (48).

Dans toutes ces applications, l'anhydride sulfureux est utilisé pour ses propriétés antiseptiques, ou bien pour le pouvoir inhibiteur qu'il présente envers certaines enzymes et en particulier la polyphenol oxydase.

Malgré un usage aussi largement répandu, le mode d'action de l'anhydride sulfureux reste obscur. Ce composé est extrêmement réactif : c'est un réducteur énergétique, il donne facilement des composés d'addition non seulement avec les aldéhydes et les cétones, mais aussi avec les liaisons éthyléniques et les amines. Parmi toutes les réactions possibles, il n'est donc pas commode de retrouver celles qui sont responsables de l'action inhibitrice ou antiseptique.

Le but de ce travail est d'étudier l'inhibition que provoque l'anhydride sulfureux sur la respiration d'une souche d'*Acetobacter*. On connaît depuis longtemps ses actions bactériostatique et bactéricide, pour lesquelles les *Acetobacter* s'étaient révélés des organismes particulièrement sensibles (71). Nous avons pensé que cette espèce conviendrait particulièrement bien à notre étude. En effet, ces bactéries qui supportent des acidités élevées, permettent d'étudier l'inhibition dans une large gamme de pH.

Le travail que nous allons présenter sera divisé en trois parties. Dans la première, nous étudierons l'oxydation de l'éthanol par une souche d'*Acetobacter rancens* que nous avons isolée et identifiée. On démontrera que cette réaction peut être inhibée par l'acide sulfureux et qu'il s'agit d'une inhibition réversible non compétitive avec le substrat. Les résultats expérimentaux ont été obtenus par des mesures de respiration en présence d'éthanol, et en utilisant la technique micromanométrique de WARBURG.

Dans une deuxième partie, on mettra en évidence la fixation du sulfite sur les bactéries. Ce phénomène sera étudié en fonction du pH et de la température. On démontrera qu'il est réversible et qu'il possède un intérêt biologique puisqu'il n'existe que dans les bactéries vivantes. Cette étude a été réalisée en employant du sulfite radioactif dont on a mesuré la distribution, entre la phase liquide et les bactéries, au moyen d'un compteur de Geiger Muller.

La troisième partie sera consacrée à la mise en évidence d'une nouvelle réaction chimique, qui se produit entre le sulfite et la cystéine, car elle peut servir de modèle à la fixation du sulfite sur les bactéries. L'existence d'une combinaison sera déduite de la modification que subit le spectre du sulfite lorsqu'on y ajoute de la cystéine. L'étude quantitative du phénomène sera faite par la méthode des variations continues de Job, et on démontrera que la liaison des deux molécules se fait par l'intermédiaire de la fonction thiol. Ces résultats ont été déduits des mesures spectrophotométriques dans l'ultra-violet.

Dans la conclusion de ce travail, nous passerons en revue les diverses théories proposées pour expliquer l'action inhibitrice de l'acide sulfureux. En les discutant, nous montrerons qu'aucune n'est satisfaisante pour rendre compte de l'inhibition que nous avons étudiée avec *A. rancens*. En revanche, nous indiquerons les grandes analogies qui existent entre les trois phénomènes étudiés :

- inhibition de l'oxydation de l'éthanol ;
- fixation du sulfite sur les bactéries ;
- réaction du sulfite avec les corps ayant une fonction thiol.

Ceci nous amènera à proposer un mécanisme nouveau dans lequel l'inhibition s'explique par la réaction du sulfite avec les fonctions thiols de la protéine enzymatique.

L'exposé de ces résultats expérimentaux sera précédé d'une revue bibliographique des travaux concernant la réaction du sulfite sur les liaisons disulfures, et d'une analyse des diverses inhibitions de réactions enzymatiques qu'il est susceptible de provoquer.

Un chapitre spécial décrira d'une manière détaillée les techniques que nous avons utilisées, et fournira leur justification.

Ce travail a été réalisé à la Station de Technologie Végétale de l'Institut National de la Recherche Agronomique à Versailles. Les expériences faisant appel aux techniques des traceurs radioactifs et de spectrophotométrie ont été effectuées au Laboratoire des Isotopes de l'Institut Pasteur à Paris.

---

## CHAPITRE PREMIER

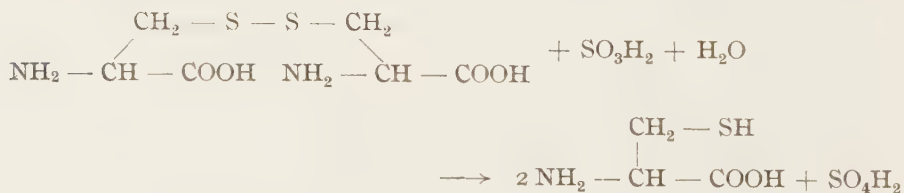
### TRAVAUX ANTÉRIEURS CONCERNANT CERTAINES RÉACTIONS DE L'ACIDE SULFUREUX

L'acide sulfureux peut prendre part à un très grand nombre de réactions, mais toutes n'offrent pas le même intérêt biochimique. Cette revue est limitée à celles qui sont utiles à l'interprétation ou à la discussion de nos résultats.

Dans une première partie on examine la réaction de l'acide sulfureux sur les liaisons disulfures, ou réaction de Clarke. On l'étudie d'abord sur des corps de composition chimique bien définie, en particulier la cystine, puis on l'étend à des corps beaucoup plus complexes, tels que l'insuline, et aussi à des corps beaucoup moins bien définis comme la laine ou le venin de serpent. La deuxième partie est consacrée aux diverses inhibitions enzymatiques provoquées par l'acide sulfureux. Il est possible de les attribuer à trois réactions chimiques différentes : soit à sa combinaison avec un produit intermédiaire aldéhydique ou cétonique, soit à la formation d'un sulfonate doué de propriétés inhibitrices, soit enfin à sa combinaison avec le diphosphopyridine-nucléotide oxydé ou réduit.

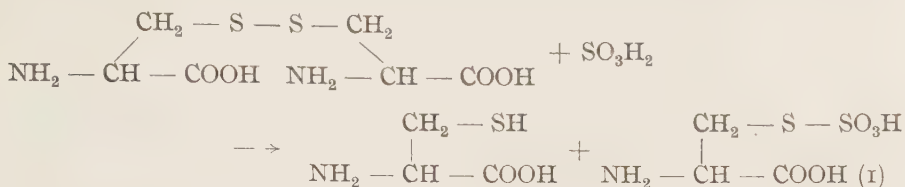
#### I. — Réaction de l'acide sulfureux sur les liaisons disulfures.

Jusqu'en 1932, on a admis que le sulfite pouvait réduire la cystine en cystéine suivant la réaction :



Étudiant cette réaction, CLARKE (16) n'a pas trouvé de formation de sulfate et seulement la moitié de la cystéine prévue par l'équation. En revanche, il a mis en évidence un nouveau composé, qu'il appelle

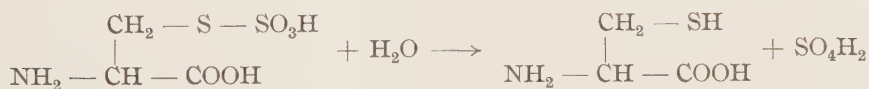
l'acide S-cystéine sulfonique. La réaction a dû être modifiée en conséquence et elle est parfaitement représentée par l'équation suivante :



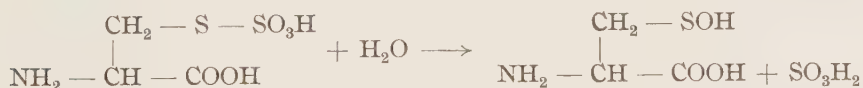
Depuis sa découverte, cette réaction (1) est habituellement désignée sous le nom de réaction de Clarke. La dénomination acide S-cystéine sulfonique est employée à peu près sans interruption par les auteurs et on la trouve encore dans les publications de KOLTHOFF (81), le dernier en date (1955). Dans les études concernant l'oxydation biologique du sulfite, la tendance actuelle paraît être de désigner le même composé comme l'acide cystéine thiosulfonique. HANDLER et FRIDOVICH (38), qui utilisent cette terminologie, lui attribuent par erreur la formule suivante  $\text{R} - \text{S} - \text{SO}_3^-$ . En discutant leur travail, SÖRBO (77) a fait remarquer que le nom de thio-sulfonate est habituellement appliqué par les chimistes organiciens aux corps ayant la structure  $\text{R} - \text{SO}_2 - \text{S}^-$ . Il propose que le produit de la réaction du sulfite sur la cystine soit appelé ester thiosulfonique. Dans ce travail nous avons adopté la dénomination employée par CLARKE (16), puisqu'elle est encore la plus largement utilisée.

L'acide lui-même n'a pas été isolé, mais ses sels d'ammonium et de sodium ont été préparés. Ils présentent les propriétés suivantes : bonne solubilité dans l'eau, même pour le sel d'argent, et insolubilité dans l'alcool.

L'hydrolyse acide se réalise en 24 heures à 125° dans un mélange d'acides chlorhydrique et formique. Le soufre se retrouve en partie égale sous forme de sulfate et de cystéine. Dans ce cas, il ne se produit jamais de sulfite. La réaction serait donc :

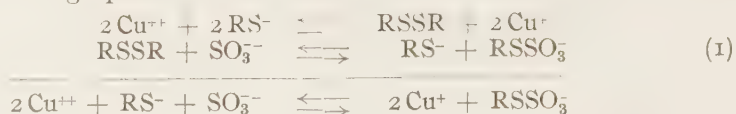


En milieu alcalin, selon ELSWORTH et PHILLIPS (25), l'hydrolyse donne naissance à du sulfite et de l'acide cystéine sulfénique.



KOLTHOFF et STRICKS (52) ont montré que la réaction de Clarke peut être complète lorsqu'on la réalise en présence d'un réactif oxydant des groupes thiols. Ainsi, en l'absence d'oxygène, en présence de sel cuivrique et à condition que le rapport moléculaire du cuivre et de la cystéine soit

de 2 à 1, on obtient les réactions du schéma suivant qui peuvent être suivies par polarographie :



La constante apparente de dissociation pour l'équation (1)  $\frac{[\text{RS}^-][\text{RSSO}_3^-]}{[\text{RSSR}][\text{SO}_3^{--}]}$  varie de  $0,6 \cdot 10^2$  à pH 13,4 jusque  $8,9 \cdot 10^2$  à pH 7,75. Ceci provient de ce que le pH modifie la dissociation de la fonction thiol de la cystéine ainsi que celle des fonctions amines. STRICKS et KOLTHOFF (80) ont montré que l'acide dithioglycolique donne aussi une réaction de Clarke avec une constante apparente de  $5 \cdot 10^4$ . MICHEEL et EMDE (61) ont aussi trouvé que le glutathion oxydé se comporte, en présence de sulfite, de la même façon que la cystine.

Tous ces travaux montrent que la réaction de Clarke se produit facilement avec un certain nombre de composés chimiques définis possédant une liaison disulfure. Nous allons voir que ceci est encore vrai dans le cas de composés plus complexes, qui renferment des liaisons disulfures.

## II. — Réaction de l'acide sulfureux sur les protides.

### a) L'insuline.

Ce polypeptide qui contient trois liaisons disulfures est inactivé par l'acide sulfhydrique, la cystéine, le glutathion et l'acide sulfureux. Le fait a été constaté par MILLER et DU VIGNEAUD (62) et étudié par CECIL et LOENING (13). La réaction a été suivie par titrage ampérométrique au nitrate d'argent du groupe thiol formé, dans une zone de pH allant de 2,8 à 9 et des températures comprises entre 25° et 60°. L'étude cinétique du phénomène est rendue impossible par le fait que l'insuline ayant partiellement réagi sur le sulfite devient insoluble.

Les résultats suivants ont été obtenus.

Entre pH 2,8 et 5,5 la réaction est lente, après 2 à 4 heures une seule liaison disulfure est touchée.

Entre pH 6,2 et 7,2 la réaction est plus rapide, après 10 à 30 minutes deux liaisons sont touchées.

Entre pH 7,2 et 9,0 le thiol s'ionise et la réaction devient réversible. Les liaisons ayant réagi diminuent de 2 à pH 7,2 jusqu'à 0,4 à pH 9.

On constate, qu'entre les pH 7 et 9, les trois liaisons disulfures réagissent complètement si la réaction est faite en présence d'acide phénylmercurique.

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus en faisant agir l'acide sulfureux sur la cystine ou le glutathion oxydé, on constate deux particularités.

a) La réaction se produit à pH 2,8 avec l'insuline, ce qui suggère que  $\text{SO}_3\text{H}^-$  peut intervenir alors que les disulfures simples ne réagissent qu'avec  $\text{SO}_3^-$  jusqu'à un pH voisin de 9.

b) Alors que les disulfures réagissent entièrement avec  $\text{SO}_3^-$ , les liaisons disulfures de l'insuline semblent subir l'influence des fonctions qui les entourent et la réaction ne peut être complète qu'en présence d'un agent de précipitation des thiols. En particulier, la proximité de charges négatives dues à l'ionisation du groupement carboxyle diminue la vitesse de réaction des liaisons disulfures (14).

La réaction du sulfite sur l'insuline se produit facilement. Elle a été réalisée dans les conditions suivantes par MICHEEL et EMDE (61). A 90 mg d'insuline cristallisée dissous dans 2 ml d'eau, on ajoute 5 ml d'une solution d'acide sulfureux à 5 p. 100 et on laisse trois jours en contact. La solution est séchée dans un dessiccateur, reprise dans l'eau et privée de sulfate et de sulfite par addition d'acétate de baryum. Après un nouveau séchage par le vide, il reste 34 mg de produit insoluble A et une fraction soluble B.

Si l'on fait réagir l'insuline sur le bisulfite à pH 4,5 on obtient davantage de produit insoluble. L'hydrolyse acide de ces produits ne libère pas de l'acide sulfureux, mais de l'acide sulfurique comme le S-cystéine sulfonate.

|                   |               | $\text{SO}_2$ dégagé pendant<br>l'hydrolyse | $\text{SO}_4$ dans le résidu % S |
|-------------------|---------------|---------------------------------------------|----------------------------------|
| Insuline pH : 2   | B soluble ... | o                                           | 0,18                             |
|                   | A insoluble.. | o                                           | 0,69                             |
| Insuline pH : 4,5 | A insoluble.. | o                                           | 1,06                             |

Les diverses études faites sur l'insuline sont donc concordantes : elles montrent que la réaction du sulfite sur ce polypeptide est bien une réaction de Clarke, un peu compliquée par les structures qui entourent les liaisons disulfures et modifient leur aptitude à réagir.

#### b) Le venin de serpent.

La neurotoxine purifiée du venin de *Naja tripudians* est inactivée par le sulfite. Cette constatation avait été expliquée par SLOTTA (75) comme le résultat d'une réaction de Clarke. Mais MICHEEL et EMDE (61) ont montré que l'inactivation est d'autant plus forte que le milieu est plus acide, alors que la réaction de Clarke se produit d'autant mieux que le milieu est plus alcalin. La toxine n'est pas inactivée par l'acide sulfhydrique, la cystéine ou le glutathion comme l'insuline.

Comme avec les autres peptides et protéines déjà étudiés, on retrouve avec la neurotoxine, un produit insoluble de poids moléculaire élevé, en quantité d'autant plus importante que le pH augmente de 2 à 6. En même temps, il se forme d'autant plus de sulfate dans le résidu d'hydrolyse du produit insoluble. Ces modifications sont encore explicables par la rup-

ture des liaisons disulfures. Il se forme aussi le sel de sodium d'un produit soluble de faible poids moléculaire (59) (60).

La substance insoluble, obtenue par action de l'acide sulfureux sur la neurotoxine, présente une particularité, celle de redonner, à l'hydrolyse, de l'acide sulfureux en quantité importante par rapport au sulfate produit. Cette particularité n'a été retrouvée dans aucun des autres composés étudiés. Il est donc évident que le mode de liaison du sulfite n'est pas le même dans la neurotoxine et dans le S-cystéine sulfonate. Le fait que la neurotoxine soit si facilement inactivée par le sulfite en milieu acide, conduit à l'hypothèse que le sulfite doit se combiner au groupement prosthétique.

La conclusion de ces études est que l'acide sulfureux peut donner avec les polypeptides une réaction différente de celle étudiée par CLARKE. Sur le mode de liaison, on ne peut jusqu'ici faire que des hypothèses. S'il s'agit d'une fonction acide sulfonique, la liaison entre le soufre et le carbone doit être influencée par un groupement voisin, comme c'est le cas pour les acides  $\alpha$ -hydroxy sulfoniques ou combinaisons bisulfoniques. Ces composés sont en effet beaucoup moins stables que les acides sulfoniques n'ayant pas de fonction hydroxyle en position  $\alpha$ . Selon MICHEEL et BODE (60) il est vraisemblable, mais pas certain, que l'acide sulfureux réagit sur un groupement contenant déjà du soufre.

### c) La laine.

La réaction des sulfites sur la laine présente un intérêt économique considérable puisqu'ils sont utilisés :

- a) Dans le blanchiment.
- b) Dans le bain antichlore qui suit le traitement aux halogènes ayant pour but de rendre la laine irrétrécissable.
- c) Dans le bain qui suit le traitement au permanganate (blanchiment et diminution du feutrage).

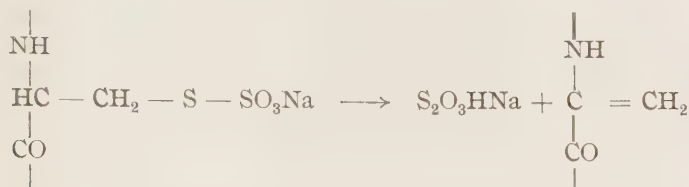
Il a été vérifié que ces traitements doux sont sans action sur les liaisons disulfures (1).

Il n'en est plus de même avec un traitement plus énergique : par exemple un trempage de 17 heures dans une solution de sulfite à 3 p. 100 à divers pH. On observe alors la réaction de Clarke, qui est mesurée après hydrolyse, aussi bien par la détermination des fonctions thiols libérées que du S-cystéine sulfonate formé. Appliquant cette technique, ELSWORTH et PHILLIPS (25), ont constaté que le pH optimum de la réaction se situe à 5 et ils concluent que seuls les ions  $\text{SO}_3\text{H}^-$  interviennent dans la réaction, qu'ils décomposent ainsi :



Toutes les liaisons disulfures de la laine ne réagissent pas. Dans les meilleures conditions seulement les 2/3 réagissent.

Par réaction prolongée à haute température, le groupement S-cystéine sulfonate peut se décomposer en faisant apparaître un résidu amino-acrylique (26).



Le comportement de la kératine des cheveux envers le sulfite est analogue à celui de la laine (78).

Ces études montrent que la réaction découverte par CLARKE est très générale. On la retrouve avec tous les corps possédant une liaison disulfure, et elle se produit même avec des corps insolubles comme la laine. Des divergences subsistent cependant pour expliquer le mode d'action des sulfites. Pour SPEAKMAN (78), CECIL et LOENING (13), MC PHEE (57) la réaction est due aux ions  $\text{SO}_3^{--}$ ; au contraire pour ELSWORTH et PHILLIPS (25) ce sont les ions  $\text{SO}_3\text{H}^-$  qui réagissent.

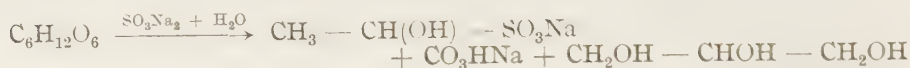
### III. — Inhibition des réactions enzymatiques par l'acide sulfureux.

L'action de l'acide sulfureux comme inhibiteur de réactions enzymatiques a reçu de nombreuses applications pratiques que nous avons déjà signalées. En revanche, il est rarement utilisé dans les [travaux d'enzymologie, et il n'est pas habituellement cité dans les listes d'inhibiteurs. Il est cependant possible de retrouver dans la littérature un petit nombre d'études dans lesquelles le sulfite a été employé comme inhibiteur de réactions enzymatiques. Nous nous proposons de faire une analyse de ces travaux, en les répartissant en trois groupes d'après son mode d'action. Dans les fermentations déviées, il intervient par suite de sa combinaison avec un composé intermédiaire, aldéhydique ou cétonique. L'inhibition peut aussi être due à la formation de sulfonates et enfin à une combinaison avec le diphosphopyridine nucléotide.

#### a) Fermentations déviées.

Le premier exemple de l'inhibition d'une fermentation par le sulfite est rapporté par NEUBERG et REINFÜRTH (64). La levure mise en présence de sucre et de bisulfite ne produit pas d'éthanol, mais donne du glycérol

et de l'éthane  $\alpha$ -hydroxysulfonate de sodium dans les proportions indiquées par la formule suivante :



Le schéma d'EMBDEN MEYERHOF permet d'expliquer l'apparition de ces nouveaux produits, lorsqu'on admet que l'éthanal est soustrait dès sa formation à toute action enzymatique, à cause de sa grande affinité pour le sulfite. Dans ces conditions, l'éthanal ne peut plus servir d'accepteur d'hydrogène pour le diphosphopyridine nucléotide réduit et c'est l'ester phosphorique de la dihydroxyacétone, en équilibre d'ailleurs avec le 3-phosphoglycéraldéhyde qui est réduit à sa place et donne naissance au glycérol.

Cette réaction se produit à pH neutre, sans multiplication des levures. D'après UNDERKOFER (84), la réaction cesse lorsque le pH est inférieur à 6,5, par suite de la toxicité du sulfite. Les expériences de FREEDMAN et DONALD (30) montrent que l'action défavorable du sulfite se manifeste sur la croissance, la vitesse de fermentation et le temps de survie des levures, d'autant plus intensément que le milieu est plus acide. Il apparaît donc que le sulfite n'agit pas uniquement par le mécanisme enzymatique que nous avons indiqué, mais inhibe aussi la plupart des activités de la levure.

Avec les bactéries acétiques NEUBERG et NORD (63) sont parvenus à transformer l'éthanol en éthanal en effectuant la fermentation en présence de sulfite de Ca, dans un milieu proche de la neutralité.

Dans une étude consacrée à la décarboxylase de l'acide pyruvique, WALLERSTEIN et STERN (87) constatent que cette réaction enzymatique peut être inhibée par le sulfite. L'inhibition est très forte à pH = 6,2 à condition que le sulfite soit stœchiométriquement en excès par rapport au pyruvate ; elle est indépendante de l'état de pureté et de dispersion de l'enzyme ; elle peut être réduite en ajoutant un excès de pyruvate et non pas en ajoutant de la carboxylase ou de la cocarboxylase. Il apparaît clairement que l'inhibition est due à la formation d'un composé d'addition entre le sulfite et l'acide pyruvique, ce composé n'étant pas décarboxylé par l'enzyme. Dans les conditions où ont été faites les mesures, le sulfite n'intervient pas à la suite d'une action directe sur la protéine enzymatique ou la coenzyme ; son action est due à sa combinaison avec le substrat. Cette conclusion est importante car on connaît depuis longtemps le clivage par le sulfite de la thiamine, coenzyme de la carboxylase. Il était donc normal de se demander si l'inhibition n'était pas due précisément à cette réaction.

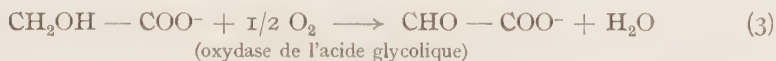
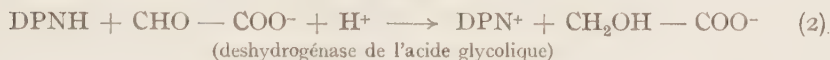
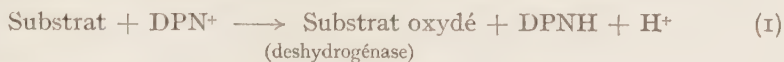
ZELITCH (93) observe que la deshydrogénase de l'acide glyoxylique, dont l'activité est mesurée par oxydation du phosphopyridine nucléotide

réduit, est entièrement inhibée par le bisulfite à la concentration de 0,01 M. L'inhibition est levée par addition de glyoxylate à la même concentration, ce qui prouve bien qu'elle est due à la combinaison du sulfite avec le substrat.

Toutes les inhibitions qui relèvent de ce mode d'action présentent les particularités suivantes. Elles exigent que le sulfite soit en excès par rapport au substrat. Elles sont réversibles. Elles se produisent entre pH 6 et 7, avec des quantités importantes de sulfite, c'est-à-dire dans la zone où les combinaisons bisulfitiques se forment rapidement et sont peu dissociées.

### b) Formation d'un sulfonate.

Il peut aussi se faire que le composé d'addition qui se forme entre le sulfite et le substrat ne soit pas dépourvu de toxicité pour l'enzyme. Un tel cas a été étudié par ZELITCH (93) sur un système enzymatique isolé des feuilles de tabac et capable de provoquer les réactions suivantes :



La réaction (3) est inhibée à pH 8,3 par le sulfite et plusieurs composés bisulfitiques. A la concentration  $5 \cdot 10^{-5}$  M,

le bisulfite de sodium produit une inhibition de 57 p. 100 ;  
le méthane  $\alpha$ -hydroxy sulfonate de sodium, une inhibition de 62 p. 100 ;  
l'éthane  $\alpha$ -hydroxy sulfonate de sodium, une inhibition de 66 p. 100 ;  
le sulfoglyoxylate de sodium, une inhibition de 67 p. 100.

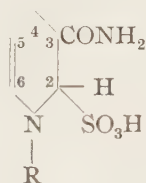
L'étude de cette inhibition montre qu'il y a compétition du substrat glycolate, avec l'inhibiteur hydroxysulfonate. La constante de MICHAELIS pour le glycolate est  $3,8 \cdot 10^{-4}$  M, alors que celle de l'inhibiteur est 1,7 à  $1,9 \cdot 10^{-6}$  M. Le bisulfite de sodium n'est pas inhibiteur par lui-même, mais par l'intermédiaire de sa combinaison avec l'acide glyoxylique qui se forme. L'inhibition est indépendante du pH de 6,4 à 8,3. Les composés  $\alpha$ -hydroxy-sulfoniques et les sulfites sont aussi actifs, à la même concentration, sur la deshydrogénase de l'acide lactique et, à concentration 10 fois plus forte, sur la deshydrogénase de l'acide d-glycérique.

Il faut noter qu'il s'agit là de deux enzymes à diphosphopyridine nucléotide et qu'on ne doit pas exclure une combinaison du sulfite avec cette coenzyme dans le genre de celles qui vont être décrites ci-dessous.

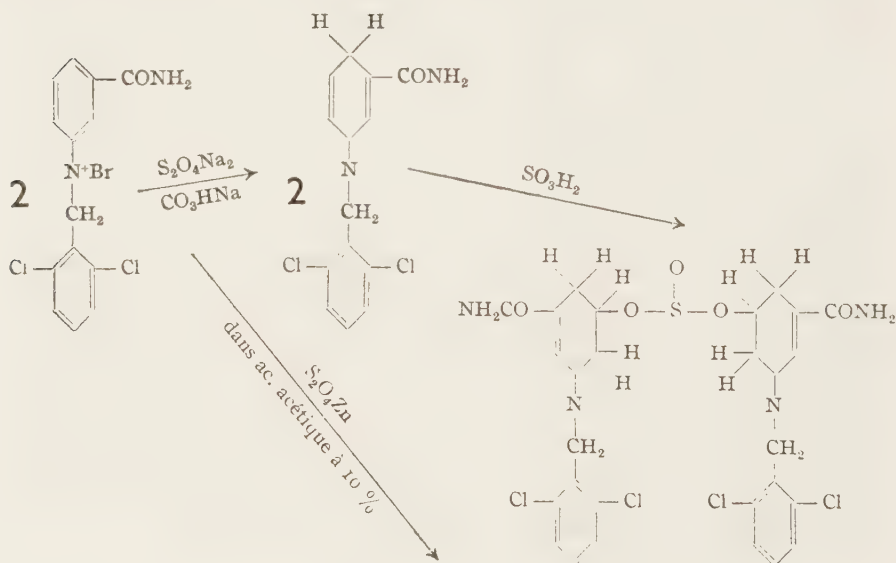
c) **Combinaison du sulfite avec le diphosphopyridine nucléotide (DPN)**

L'existence d'un composé d'addition entre le DPN et le sulfite est présumée depuis les observations spectrophotométriques de HASS (39). Cet auteur a montré en effet que le DPN réduit n'est pas stable en milieu acide à pH inférieur à 6, ce qui détermine sa perte d'activité comme donneur d'hydrogène et un déplacement du maximum d'absorption à 340 m $\mu$  vers des longueurs d'onde plus courtes. Si on utilise l'acide sulfureux à la place de l'acide chlorhydrique, il se forme un produit d'addition stable.

MEYERHOF, OHLMEYER et MOHLE (58) indiquent aussi que le DPN réagit sur les sulfites pour donner un complexe ayant un spectre d'absorption ressemblant à celui du DPN réduit. D'après les mêmes auteurs, la structure suivante a été proposée par KUHN.



WALLENFELS et SCHÜLY (86) travaillant avec un analogue du DPN, le bromhydrate de dichlorobenzyl nicotinamide, ont pu obtenir, en faisant agir le sulfite sur le produit préalablement réduit, un corps cristallisé qui correspondrait à la formule suivante :



La structure est déduite de l'analogie du spectre de ce produit d'addition avec celui de l'ester éthylique de l'acide 1, 4, 5, 6 tétrahydro N<sub>1</sub> méthyl nicotinique. Ce qui mène les auteurs à conclure à l'identité des chromophores dans les deux molécules ( $> \text{N} - \text{CH} = \text{CH} - \text{C} -$ ).



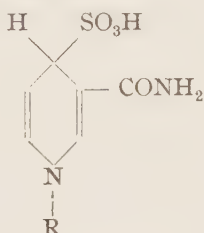
PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND (68) ont constaté que la deshydrogénase de l'acide lactique extraite du cœur de porc est inhibée par les préparations de DPN réduites avec le dithionite, et ils ont rapporté ce phénomène à la présence de sulfite. A pH 7,2 ils obtiennent avec des produits cristallisés 50 p. 100 d'inhibition pour une concentration en sulfite de 5 µg/ml. L'inhibition s'observe dans les deux sens de réaction,



alors que ZELITCH (93) n'avait constaté d'inhibition que pour la réaction (2).

L'inhibition augmente en même temps que la concentration en DPN oxydé. Cette observation a conduit les auteurs à rechercher s'il n'existe pas un composé d'addition entre ces deux produits.

En milieu dilué, il ne leur a pas été possible de mettre en évidence, même par spectrophotométrie, une combinaison, par suite de sa dissociation très importante. Mais si l'on ajoute à une solution diluée de DPN et de sulfite des quantités croissantes de deshydrogénase de l'acide lactique, il se produit une très nette augmentation de l'absorption à 320 mµ, qui dans une large mesure est proportionnelle à la quantité de protéine ajoutée. Le phénomène ne se retrouve plus si on ajoute au mélange une protéine non enzymatique. Les auteurs expliquent ce qui précède en admettant que le sulfite donne un produit d'addition avec le DPN oxydé qui est stabilisé par sa fixation sur la protéine. Ils proposent la structure suivante



où le sulfite est fixé en position 4. L'affinité de ce composé pour la protéine serait extrêmement forte. Le sulfite peut cependant être partiellement éliminé par une dialyse prolongée et l'inhibition diminue à la suite d'une dilution.

En ajoutant des quantités croissantes de DPN et de sulfite à une

solution pure d'enzyme, il est possible de déterminer les molécules de DPN liées à une molécule d'enzyme.

Le cyanure et l'hydroxylamine ne donnent pas des modifications spectroscopiques analogues en présence d'enzyme, ce qui correspond bien au fait qu'ils ne sont pas inhibiteurs pour la deshydrogénase de l'acide lactique.

Le sulfite inhibe dans les mêmes conditions la deshydrogénase de l'acide malique, et à un degré moindre, les deshydrogénases de l'acide glutamique et de l'acide glycérophosphorique, ainsi que la deshydrogénase de l'éthanol extraite du foie. Au contraire, la deshydrogénase de l'éthanol extraite de la levure est entièrement insensible à cet inhibiteur. Une explication du comportement différent des deux deshydrogénases de l'éthanol est proposée par WALLENFELS et SCHULY (86). Le sulfite ne pouvant se fixer que sur le DPN réduit, déjà combiné à la protéine, on conçoit, qu'il soit peu inhibiteur pour les enzymes dont la combinaison avec le DPN réduit est très dissociée : c'est justement le cas de la deshydrogénase de l'éthanol extraite de la levure.

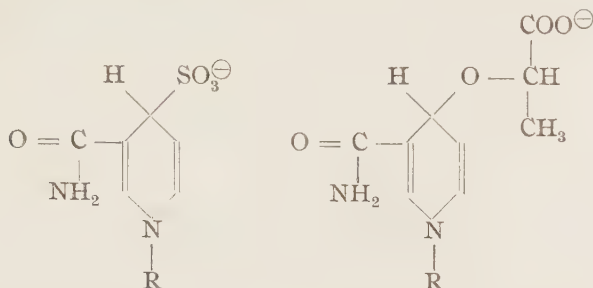
La sensibilité de ces diverses deshydrogénases peut, d'après ces auteurs, fournir une explication des propriétés désinfectantes de l'acide sulfureux. Un fait est cependant troublant, les propriétés désinfectantes apparaissent en milieu acide, alors que l'inhibition des deshydrogénases se produit très fortement en milieu neutre, sans que les auteurs aient remarqué une influence du pH.

TERAYAMA et VESTLING (83) ont aussi confirmé, que la deshydrogénase de l'acide lactique extraite du foie est fortement inhibée par les sulfites et les sulfures. L'absorption maximum à 320 m $\mu$  s'observe lorsqu'on mélange les trois composés : DPN, sulfure et enzyme. Les auteurs apportent un fait nouveau particulièrement important, c'est que le maximum d'absorption du mélange précédent disparaît lorsqu'on y ajoute un produit complexant tel que l'acide éthylène diamine tétracétique. Ceci laisse donc présumer que la liaison enzyme, DPN, inhibiteur fait intervenir les atomes de Zn, qui ont été mis en évidence dans beaucoup de deshydrogénases.

La combinaison entre le DPN et le sulfite se produit même en l'absence d'enzyme. Elle a été mise en évidence par COLOWICK, KAPLAN et CIOTTI (17) en faisant une solution très concentrée de sulfite. Le pH le plus favorable à l'existence de ce complexe est voisin de la neutralité. Lorsqu'on s'en écarte, il se dissocie en redonnant du DPN libre, que l'on a pu mettre en évidence par l'addition de cyanure.

L'existence d'une combinaison enzyme-DPN-sulfite est confirmée par la protection particulièrement efficace qu'exerce le mélange DPN-sulfite sur la dénaturation de la deshydrogénase de l'acide lactique. Comme dans ce phénomène le sulfite se montre compétitif avec le lactate,

PFLEIDERER, JECKEL, et WIELAND (68) admettent qu'ils se fixent tous les deux au même endroit sur la molécule du DPN de la façon suivante :



Ces diverses études montrent qu'il existe une combinaison entre le sulfite et le DPN, mais les auteurs ne sont pas d'accord pour savoir si la combinaison a lieu avec le produit réduit ou avec le produit oxydé. La grande ressemblance qui existe entre le spectre du DPN réduit et celui du DPN combiné au sulfite, suggère que le produit d'addition doit avoir la structure du DPN réduit, ce qui est en faveur de l'opinion exprimée par WALLENFELS et SCHÜLY. En revanche, il est difficile d'admettre avec PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND que le produit formé possède la structure d'un sulfonate. En effet, une telle liaison est extrêmement stable et le sulfite ne pourrait être détaché par une dialyse même prolongée. Malgré les divers arguments proposés, il n'est pas possible de décider si la liaison se fait sur le carbone 2, 4 ou 5 du noyau pyridine. Malgré ces incertitudes sur la structure de ce composé d'addition, il est indiscutable que le sulfite doit être considéré comme un inhibiteur de certaines enzymes à DPN.

Une étude de SCARDOVI (70 bis) rapporte l'action inhibitrice du sulfite sur l'oxydation de l'acétate par *Saccharomyces cerevisiae*. La réaction suivante :



réalisée avec un extrait à pH 7,4 est inhibée à 50 p. 100 par l'acide sulfureux, lorsque sa concentration atteint  $10 \mu\text{mol/ml}$ . Le taux de l'inhibition peut être diminué lorsqu'on augmente la concentration en coenzyme A. L'étude cinétique de la réaction montre qu'il existe une combinaison entre coenzyme et inhibiteur. C'est, à notre connaissance, la seule réaction étudiée où le sulfite se révèle comme inhibiteur d'un système faisant intervenir la coenzyme A.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

#### A. — TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES

##### I. — Description de la souche bactérienne.

Parmi les bactéries acétiques que nous avons isolées du vin, nous avons choisi pour cette étude une souche particulièrement vigoureuse et dont la culture n'offrait pas de difficultés. L'isolement a été réalisé à partir d'un vin rouge par étalement sur milieu gélosé constitué par du vin dilué au demi. Depuis 1951, cette souche était entretenue au laboratoire par des repiquages successifs sur un milieu moût de bière gélosé additionné de 2 p. 100 d'éthanol.

Pour la détermination de l'espèce, on a utilisé les tests proposés par FRATEUR (29). Nous avons aussi fait quelques autres tests, qui ont servi à préciser la description de la souche, mais dont il n'a pas été tenu compte pour la détermination.

##### a) Caractères morphologiques.

Culture en strie sur moût de bière gélosé à 2 p. 100 d'éthanol : après 8 jours, strie crème, brillante, plate à bords droits. Consistance visqueuse mais ne coulant pas. Pas de production de pigments.

Culture sur moût de bière liquide à 2 p. 100 d'éthanol : après 8 jours liquide trouble, dépôt abondant. En surface fragments de voile blanchâtre peu cohérent.

Sur eau de levure à 2 p. 100 de glycérol, pas de croissance, pas de dioxyacétone.

Sur eau de levure à 2 p. 100 de mannitol, même aspect.

Sur eau de levure à 2 p. 100 de butanediol, trouble important et pas de voile, production d'acétoïne.

Sur vin de 8°, voile blanchâtre assez épais, vin clair au début de la croissance ; après 8 jours les morceaux de voile tombent au fond du tube mais le vin reste clair.

Colonie géante sur moût de bière gélatiné : après 1 mois à 18°, colonie homogène, luisante, visqueuse. Forme circulaire, diamètre 9 mm, plate, bords entiers. Pas de liquéfaction de la gélatine.

### b) Caractères microscopiques.

Cellules le plus souvent groupées en diplobacilles trapus. Épaisseur variant de  $2\ \mu$  en milieu moût de bière, à  $1\ \mu$  sur vin. On n'a jamais observé de cellules mobiles. Toutes les cellules sont Gram-négatives.

### c) Caractères biochimiques.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 éthanol, 2 p. 100 de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  : croissance importante, dissolution du carbonate après 3 jours mais pas d'irisation.

Sur eau de levure, 2 p. 100 d'éthanol : l'oxydation de l'acide acétique se produit après le 12<sup>e</sup> jour.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 de lactate de calcium : croissance importante et formation de cristaux de carbonate, le long de la culture.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 de glucose, 2 p. 100 de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , croissance médiocre, production d'acide gluconique mise en évidence par la dissolution du carbonate. Bactérie produisant de la catalase sur ce milieu de culture.

Sur eau de levure gélosée, 2 p. 100 saccharose, 2 p. 100 de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , croissance faible, pas de production d'acide ni de pigments.

Sur milieu de Hoyer, modifié selon FRATEUR : pas de croissance.

Sur eau de levure gélosée + 2 p. 100 de glycérol : pas de croissance.

Sur eau de levure gélosée + 2 p. 100 de mannitol : pas de croissance.

Certaines propriétés biochimiques ont été confirmées par la technique des oxydogrammes. Elle consiste à déposer un amas de bactéries sur une plaque de Petri contenant la substance à oxyder dans de l'eau de levure gélosée. Après une incubation de quelques heures, se manifestent des réactions chimiques indépendamment de la croissance. Lorsque le substrat est du lactate de calcium, il apparaît dans la gélose, autour des bactéries, des cristaux de carbonate de calcium. Lorsque le milieu contient du glycérol ou du mannitol, les produits d'oxydation, dioxyacétone et lévulose, sont mis en évidence, en recouvrant la plaque de liqueur de Fehling, par l'apparition d'une coloration rouge. Dans le cas d'éthanol se transformant en acide, on ajoute à la gélose du carbonate de calcium avant de la couler : la réaction est alors indiquée par sa dissolution.

Les bactéries nécessaires à ces tests ont été prélevées sur moût de bière gélosé 2 p. 100 d'éthanol. Elles n'ont pas subi de lavage.

Avec le lactate de calcium, formation de précipité après 1 jour.

Avec le glucose, formation d'acide après 3 jours.

Avec le 2-3 butanediol, formation de substance réductrice après 6 heures.

Avec le glycérol, faible formation de substance réductrice après 6 heures.

Avec le mannitol, faible formation de substance réductrice après 6 heures.

Ces caractères, lorsqu'on consulte la clef dichotomique de FRATEUR, conduisent à identifier cette souche à *A. rancens* variété *vini* (Beijerinck) ; c'est une espèce que nous avons souvent rencontrée dans le vin, et qui est bien typique du groupe « oxydants », c'est-à-dire des bactéries possédant des propriétés oxydantes brutales sur les alcools primaires, mais à peu près sans action sur les alcools secondaires.

## II. — Conditions de culture.

Les conditions de culture ont été définies d'une façon aussi précise que possible pour obtenir des bactéries possédant des caractéristiques très voisines d'une récolte à l'autre. Parmi tous les milieux utilisables, on a donné la préférence à celui qui permet un développement suffisamment rapide dans des conditions assez proches de celles que les *Acetobacter* rencontrent dans la nature. Comme aliment carboné on a utilisé l'éthanol, de façon à ce que la croissance se fasse avec le même substrat que celui dont on étudiera l'oxydation. On a choisi un milieu acide puisque c'est un des principaux caractères des bactéries acétiques de pouvoir se développer malgré un pH bas. Une propriété assez générale des *Acetobacter* est que certaines souches deviennent incapables de transformer l'acide acétique en gaz carbonique et en eau lorsqu'elles ont été cultivées à un pH acide. Notre souche est bien dans ce cas. L'emploi de la méthode micro-manométrique de Warburg en sera donc facilité puisqu'il n'y aura pas à tenir compte du gaz carbonique dégagé par cette réaction. La potasse que l'on introduit dans les fioles ne sert alors qu'à fixer la faible quantité de gaz carbonique produite par la respiration endogène. Les recherches poursuivies par HROMATKA (40 bis) avec du carbone 14, ont montré que le gaz carbonique peut être assimilé par les bactéries acétiques pendant leur croissance, mais qu'il ne prend aucune part à la transformation de l'éthanol en acide acétique. On peut donc penser que les mesures d'oxydation de l'éthanol faites dans l'appareil de Warburg avec des bactéries non proliférantes, ne sont pas influencées par la présence ou l'absence de gaz carbonique.

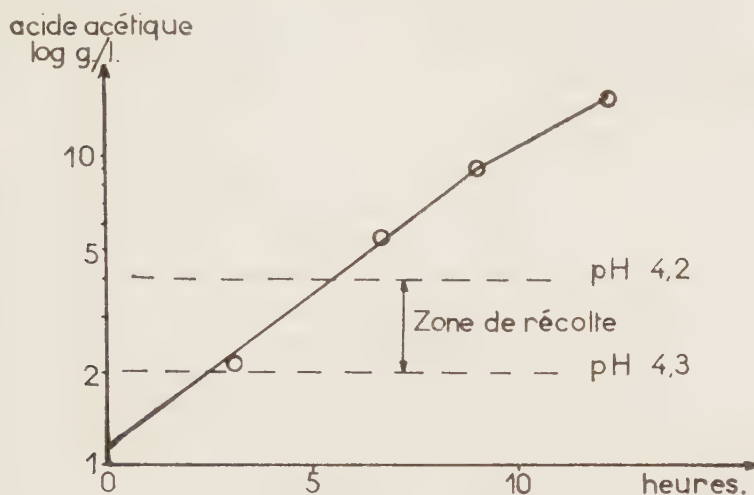
### a) Milieu de culture.

Le milieu choisi a la composition suivante :

|                                                          |         |
|----------------------------------------------------------|---------|
| Tartrate de sodium et potassium, 4 H <sub>2</sub> O..... | 22,6 g. |
| Acide phosphorique 0,2 M.....                            | 40 ml.  |
| Extrait de levure Difco.....                             | 3 g.    |
| Extrait de bœuf Difco.....                               | 3 g.    |
| Solution de sels minéraux Wright et Skeggs.....          | 5 ml.   |
| quantité suffisante pour 1 litre.                        |         |

Solution de SKEGGS et WRIGHT (74) :  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  40 g,  $\text{SO}_4\text{Mn}$ ,  $4\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{FeCl}_3$  anhydre 0,4 g,  $\text{HCl}$  pur 1 ml. Quantité suffisante pour 1 litre.

Le pH du milieu est égal à 4,5 ou voisin de ce chiffre auquel il est ajusté. On stérilise à  $110^\circ$  pendant 20 minutes et l'éthanol est ajouté ensuite à la concentraion de 2 p. 100.



GRAPHIQUE I. — Production d'acide acétique dans une culture agitée d'*A. rancens*. Les conditions sont indiquées dans le texte.

On a introduit une source d'azote importante de façon à obtenir une croissance rapide et à pouvoir récolter les microbes après 24 heures de culture. Un pouvoir tampon suffisant est assuré par le mélange tartrate double de sodium potassium, et acide phosphorique. Le choix s'est porté sur l'acide tartrique dont le  $p\,k_2 = 4,16$  convient bien dans la zone de pH qui nous intéresse. Il s'agit d'autre part d'un corps qui n'est pas facilement métabolisé par les bactéries et qui n'est donc pas susceptible d'apporter une perturbation dans le métabolisme de l'éthanol. Comme les travaux de JACOBSON et AZEVIDO (44) ont montré que *A. rancens* peut, après une adaptation, fermenter le (+) tartrate, nous avons vérifié que, dans les conditions où nous avons réalisé la culture, cette souche est incapable de l'oxyder ou de le décarboxyler. C'est cette raison qui a fait préférer le tartrate à l'acétate, citrate, succinate ou malate.

Un inconvénient des tampons contenant du tartrate est qu'on ne peut les utiliser qu'à faible concentration, par suite du peu de solubilité du tartrate acide de potassium qui tend à précipiter lorsque l'acidité augmente. Pour le milieu que nous utilisons, la précipitation ne commencera qu'au-dessous de pH 4,1. Comme le montre le graphique I, l'efficacité du tampon est suffisante pour conserver un pH de 4,2 lorsque le milieu contient 4 g/l d'acide acétique.

### b) Réalisation de l'aérobiose.

Les cultures ont été obtenues dans des fioles placées sur agitateur alternatif. Il s'agit de fioles d'Erlenmeyer de 1 litre, à grande ouverture, chacune contenant 100 ml de milieu. La fermeture est constituée par une mince couche de coton maintenue entre deux nappes de gaze. L'ensemble est tendu sur le goulot de la fiole par une bague de caoutchouc. L'agitateur utilisé donne 120 aller et retour par minute et une amplitude de déplacement de 7 cm. Le système de fermeture adopté est bien supérieur à celui du bouchage au coton, car il permet une excellente diffusion de l'oxygène. On peut voir en effet, sur le graphique 1, que le métabolisme des bactéries n'est pas limité par un manque d'oxygène dans la culture. On remarque que la production d'acide acétique est bien un phénomène exponentiel tant que le milieu contient moins de 10 g/l d'acide acétique. Comme la récolte est faite lorsque le milieu contient environ 4 g/l d'acide, on est sûr que les bactéries ont toujours disposé d'un excès d'oxygène pendant leur croissance. Les travaux de HROMATKA et EBNER (41) ont montré que, dans les cultures d'*Acetobacter*, la croissance et la production d'acide acétique étaient deux phénomènes exponentiels et qu'il était possible de suivre leur développement aussi bien en mesurant l'opacité des suspensions qu'en titrant l'acidité apparue dans le milieu. C'est ce qui explique que l'on se soit contenté, dans l'expérience du graphique 1, de déterminer l'acidité volatile.

### c) Préparation de la suspension de bactéries non proliférantes.

Une fiole contenant 100 ml du milieu est ensemencée avec 0,2 à 0,4 ml d'une préculture faite sur le même milieu. Après 16 heures d'agitation à 24°, on a atteint une concentration en acide acétique de 2 à 4 g/l. Le pH est descendu entre 4,3 et 4,2 et la culture se trouve encore en phase exponentielle de croissance.

A ce moment la fiole est refroidie dans la glace fondante en maintenant l'agitation, le liquide centrifugé 10 minutes à 3000 g, le culot lavé une fois avec son volume d'eau glacée, lavé une seconde fois en amenant le pH du milieu à 6 avec de la soude 0,01 N, pH contrôlé avec du papier indicateur. Après centrifugation, ces bactéries sont remises en suspension dans un volume d'eau approprié à l'importance de la récolte. Elles sont conservées sur la glace fondante et utilisées dans les 4 heures qui suivent.

Pour obtenir des suspensions bactériennes actives, il est indispensable d'éviter que les bactéries manquent d'oxygène au moment de la récolte. C'est la raison pour laquelle il faut continuer à saturer d'air le milieu pendant qu'on le refroidit. Au voisinage de zéro degré, la con-

somation d'oxygène est suffisamment faible pour qu'on puisse centrifuger. On sait en effet, que les bactéries acétiques meurent rapidement lorsque dans un milieu acide contenant un substrat, elles viennent à manquer d'oxygène (42).

Les bactéries, après leur premier lavage, continuent à acidifier l'eau dans laquelle on les remet en suspension. De plus, elles se présentent sous une forme floculée qui rend difficile un lavage plus complet et qui empêche de les répartir avec précision au cours des expériences. C'est la raison pour laquelle on relève le pH au cours du second lavage, ce traitement dispersant instantanément les bactéries.

#### d) Préparation d'un extrait enzymatique.

Les expériences réalisées avec des cellules entières doivent toujours tenir compte de la perméabilité de la membrane. C'est pourquoi il nous a paru utile dans cette étude de pouvoir effectuer des expériences analogues avec des extraits enzymatiques. Pendant longtemps, il a été impossible d'obtenir de telles préparations avec les *Acetobacter*. Le broyage des bactéries avec du quartz avait déjà été essayé sans succès par BUCHNER et MEISENHEIMER (9) en 1903, puis par ROTHENBACH et EBERLIN (70) en 1905. En 1928, WIELAND et BERTHO (89) ont cherché à produire l'autolyse par diverses substances, chloroforme, éther acétique, chlorure de sodium, et aussi par congélation des bactéries. Ces techniques, qui avaient cependant réussi pour des espèces différentes, étaient en échec dans ce cas particulier. Les premières préparations actives ont été obtenues par FRANZL et CHARGAFF (28) en 1951, puis par KING et CHELDELIN (50) en 1954. Nous avons pu appliquer un traitement analogue à nos bactéries et obtenir par broyage un extrait enzymatique qui présentait encore une activité importante.

L'agent de broyage est primordial dans cette opération. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec de la poudre de verre pyrex que nous avons préparée nous-même, dans un broyeur à boulets de porcelaine, à partir de morceaux nettoyés avec le plus grand soin. On a utilisé uniquement la partie passant au tamis 200. La poudre de pyrex que l'on trouve dans le commerce ne permet pas d'obtenir un extrait actif. Le lavage que nous lui avons fait subir, d'abord dans l'acide chlorhydrique, puis dans l'eau, ne modifie en rien ce résultat négatif.

Toutes les opérations qui suivent sont effectuées dans une chambre froide à 0° et en n'utilisant que du matériel déjà refroidi à cette température. La pâte de bactéries est placée dans un mortier de porcelaine, et on ajoute deux à trois fois son volume en poudre de verre pyrex, de façon à obtenir une pâte lisse qui se détache facilement des parois du récipient. On broie vigoureusement pendant 10 minutes en détachant à la spatule les parties qui restent adhérentes au pilon.

Le produit du broyage est extrait pendant 20 minutes, en remuant sous agitation douce, avec du tampon phosphate 0,05 M, pH 6, ou avec de l'eau distillée ramenée au même pH. On ajoute 30 ml d'eau par gramme de microbes (poids frais). Dans une première centrifugation de 10 minutes à 3500 g on élimine un culot contenant la poudre de pyrex et les bactéries intactes. On obtient ainsi un extrait brut dans lequel on contrôle l'absence de cellules au microscope. Ceci constitue l'extrait brut qui est soumis à une centrifugation de 30 minutes à 25 000 g. On sépare le liquide surnageant que l'on désigne sous le nom d'extrait clair et un culot remis en suspension dans l'eau ou le tampon, qui constitue les granules. L'examen de ces deux fractions au microscope électronique, après ombrage au palladium, montre que l'extrait clair contient encore des particules solides. Quant aux granules, ils sont constitués par des débris de tailles très diverses. On y reconnaît principalement des structures granulaires qui sont déjà visibles dans les cellules avant le broyage et surtout les membranes cellulaires qui conservent grossièrement la forme des bactéries.

Le tableau I donne un exemple de cette préparation et de l'activité qui subsiste dans les deux fractions.

TABLEAU I  
*Préparation d'un extrait d'A. rancens.*

| Fractions                                    | Volume ml | N mg/ml | Poids sec<br>mg/ml | Activité <sup>(1)</sup><br>μl O <sub>2</sub> /h ml | Activité<br>spécifique par<br>mg poids sec |
|----------------------------------------------|-----------|---------|--------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Suspension bactéries non proliférantes ..... | 100       | 2,18    | 24,8               | 16 000                                             | 645                                        |
| Granules .....                               | 33        | 0,72    | 8                  | 1 600                                              | 200                                        |
| Extrait clair .....                          | 100       | 1,5     | 12                 | 465                                                | 39                                         |

(<sup>1</sup>) Activité déterminée par la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30° C  
Mélange réactionnel : — Tampon Mc. Ilvaine pH 3,8 concentration en PO<sub>4</sub> ≡ 0,035 M. — Ethanol 0,05 M. — Bactéries 0,25 mg. Granules 0,8 mg. Extrait clair 12 mg, par fiole pour un volume final de 2,1 ml.

SMITH (76) a soumis à des centrifugations successives des extraits d'*Acetobacter* préparés dans des conditions identiques à celles que nous venons de décrire et a montré que l'activité oxydante se trouve presque uniquement localisée sur des particules solides de tailles très diverses. Il a été possible de les éliminer presque complètement au cours de centrifugations successives qui ont été poussées à 144 000 g pendant 2 heures. On a reconnu que ces particules étaient riches en cytochrome. L'extrait que nous avons préparé s'est comporté d'une façon analogue. Soumis à des centrifugations successives dans une centrifugeuse Servall développant 25 000 g et maintenue à 0°, on a constaté que l'activité du

liquide surnageant diminue au fur et à mesure que baisse la teneur en protéines. Les résultats sont rapportés dans le tableau II.

TABLEAU II  
*Perte d'activité de l'extrait clair  
au cours de centrifugations successives.*

| Temps de centrifugation<br>à 20 000 g | Protéines <sup>(1)</sup><br>en mg/ml | Activité <sup>(2)</sup><br>$\mu\text{l O}_2/\text{h.ml}$ | Activité spécifique<br>par mg de protéine |
|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 0 minutes.....                        | 10,9                                 | 1 986                                                    | 182                                       |
| 15 — .....                            | —                                    | 1 666                                                    | —                                         |
| 45 — .....                            | —                                    | 1 370                                                    | —                                         |
| 60 — .....                            | 6,6                                  | 1 200                                                    | 182                                       |

<sup>(2)</sup> Activité déterminée par la technique de Warburg. Atmosphère air. Température 30° C. Mélange réactionnel : — Tampon phosphate pH 6 : 0,033 M. Extrait clair 0,3 ml. Ethanol 0,01 M volume final 2,1 ml.

<sup>(1)</sup> Dosage des protéines par spectrophotométrie U. V. selon Warburg et Christian (88).

L'activité spécifique reste la même dans la préparation avant et après les centrifugations, alors que l'activité rapportée à un volume déterminé diminue. Ceci laisse donc supposer que l'activité oxydante vis-à-vis de l'éthanol se trouve liée au moins en partie à des particules, qui s'éliminent au cours de la centrifugation. Il n'est pas vraisemblable que l'activité se trouve localisée dans des granules de taille déterminée susceptibles d'être sédimentés en 1 heure à 25 000 g, car, s'il en était ainsi, l'activité spécifique devrait diminuer dans le liquide centrifugé. On doit donc admettre que l'activité enzymatique est associée à tous les débris cellulaires de tailles très diverses qui ne se sont pas solubilisés après le broyage des bactéries.

Le culot de centrifugation renfermant les débris contient au moins un pigment de nature hématinique. Nous avons pu disperser ce composé dans une solution de cholate de sodium à 0,8 p. 100. Après centrifugation, on a établi au spectrophotomètre le spectre de différence entre le pigment oxydé et le pigment réduit par addition de 5  $\mu$  mol/ml d'éthanol. On observe trois maximum situés à 422, 523, 554 m $\mu$ . Ceci indique la présence d'un pigment hématinique, que nous considérons, après SMITH, comme un cytochrome du groupe *b*. Il est intéressant de souligner que ce pigment n'a été observé jusqu'ici que chez les *Acetobacter*.

## B. — TECHNIQUES CHIMIQUES

### a) Dosage du sulfite.

Les solutions de sulfite utilisées au cours du travail ont été faites à partir du sulfite neutre de sodium cristallisé « Prolabo ». La solution de base de molarité 0,1 M est conservée dans une fiole bouchée à l'émeri

et renouvelée toutes les semaines. Avant l'emploi, le contenu de la fiole est homogénéisé par agitation. Afin d'éviter une diminution trop rapide du titre, les solutions et toutes les dilutions sont faites avec de l'eau déminéralisée par échangeurs d'ions, distillée dans du verre pyrex et bouillie avant l'emploi. Ces précautions ont pour but d'éviter la présence de catalyseurs d'oxydation, en particulier de cuivre et d'oxygène dissous. Le titre de la solution stock varie irrégulièrement d'un jour à l'autre, comme le montre le graphique 2. Il est donc nécessaire de le déterminer avant l'emploi.



GRAPHIQUE 2 — Diminution dans le temps du titre d'une solution 0,1 M de sulfite de sodium.

Les solutions, où l'on a été amené à doser les sulfites, avaient des concentrations s'étendant de  $2 \cdot 10^{-3}$  à  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Lorsque l'on pouvait disposer de prises d'essais importantes, 5 à 10 ml, le dosage s'est fait par iodométrie; lorsque l'on était obligé d'opérer sur des prises plus faibles, cas du dosage dans les cupules de l'appareil de Warburg, on a choisi une méthode colorimétrique plus sensible.

#### MÉTHODE IODOMÉTRIQUE

En milieu très dilué, l'iode réagit quantitativement sur le sulfite et il est possible de le titrer directement si l'on prend soin de respecter les conditions suivantes (21). La concentration en sulfite doit rester égale ou inférieure à  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Le milieu doit être acidifié par un acide fort afin d'éviter la réaction de l'iode sur l'acide sulfureux combiné. On doit maintenir une concentration en iodure de potassium de l'ordre de 1 p. 100 pour sensibiliser le virage de l'empois d'amidon.

Ces conditions sont remplies en utilisant les quantités suivantes :

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Prise d'essai .....               | 5 ml. |
| Acide sulfurique N .....          | 1 ml. |
| Iodure de potassium à 10 % .....  | 1 ml. |
| Empois d'amidon à 5 p. 1000 ..... | 1 ml. |

L'iode 0,02 N est ajoutée avec une microburette de Trevan susceptible de donner des volumes de 500  $\mu$ l avec une erreur inférieure à 1  $\mu$ l.

Après titrage du sulfite libre, la même prise d'essai peut servir à déterminer la partie combinée. Pour cela, le milieu est amené à pH 8 par addition de la quantité nécessaire de la solution alcaline de soude et de borate préconisée par JAULMES (45). Le pH est contrôlé par touches externes sur du papier pH. Dans ces conditions, le sulfite combiné se libère et peut être titré par une nouvelle addition d'iode. Le virage de l'empois d'amidon se fait en milieu alcalin avec un certain retard. Il est indispensable de faire un témoin sur une solution ne contenant pas de sulfite.

Cette méthode est aussi applicable en présence de corps microbiens, car on a vérifié que l'iode ne réagit pas rapidement sur les bactéries dans un milieu aussi acide. Cependant, comme il s'agit là d'un microdosage, nous avons fait un titrage à blanc sur un échantillon témoin ne contenant pas de sulfite. La valeur trouvée qui est toujours faible a été déduite de celle obtenue pour l'échantillon avec sulfite.

#### MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE

La coloration produite par la réaction de Schiff a été rendue quantitative par GRANT (37). Cette méthode a été adoptée et convient bien pour des quantités de sulfite comprises entre 2-10  $\mu$ g dans une prise d'essai de 1 ml. Dans les conditions décrites par GRANT, il est impossible d'utiliser une courbe d'étalonnage de l'appareil. En effet, l'intensité de la coloration dépend non seulement de la dose de sulfite dans la prise d'essai, mais aussi diminue rapidement avec l'âge du réactif utilisé. Les séries de dosages ont toujours comporté des échantillons de référence contenant des doses connues de sulfite, choisies de façon à encadrer les quantités à doser.

Étant donné que nous avons été amené à faire ces déterminations dans des milieux relativement simples et que de toute façon nous pouvions disposer comme témoin du même échantillon dépourvu de sulfite, nous les avons effectuées sans défécation préalable sur un échantillon simplement clarifié par centrifugation. A 4 ml de réactif préparé d'après GRANT, on ajoute une prise d'essai de 1 ml contenant 0 à 10  $\mu$ g de sulfite. La coloration est mesurée après 5 minutes avec un écran sélectif de 550 m $\mu$ .

On a recherché l'influence que peut exercer sur ce dosage la présence de la combinaison éthanal bisulfite qui est susceptible de se trouver dans les milieux étudiés. A cet effet, on a réalisé des dosages en présence de sel sodique de la combinaison éthanal bisulfite (éthane hydroxysulfonate de sodium) synthétisé par la méthode de BUNTE (11). En solution, ce composé se dissocie avec une constante d'équilibre égale à  $2,4 \cdot 10^{-6}$  selon KERP (49). Aux dilutions employées, il libère donc une quantité

de sulfite non négligeable qui influe sur le dosage. Il faut donc calculer dans chaque cas la partie dissociée. C'est ce que l'on a fait en utilisant le tableau donné à cet effet par CHARLOT et GAUGUIN (15). On obtient les valeurs suivantes pour les trois concentrations utilisées.

| Concentration en<br>combinaison éthanal bisulfite | % dissocié | SO <sub>2</sub> en $\mu$ g/ml |       |
|---------------------------------------------------|------------|-------------------------------|-------|
|                                                   |            | libre                         | total |
| 0,5 $10^{-4}$ M.....                              | 18,5       | 0,59                          | 3,2   |
| 1,5 $10^{-4}$ M.....                              | 11,6       | 1,11                          | 9,6   |
| 3,5 $10^{-4}$ M.....                              | 7,8        | 1,75                          | 22,4  |

TABLEAU III

*Dosage du sulfite par la méthode de Grant  
en présence de combinaison bisulfite.*

|                                                                                                        |       |       |       |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| SO <sub>2</sub> du sulfite en $\mu$ g/ml....                                                           | 6,48  | 6,48  | 6,48  | 6,48   |
| Ethanal bisulfite de Na en<br>g g/ml .....                                                             | 0     | 3,2   | 9,6   | 22,4   |
| SO <sub>2</sub> provenant de la disso-<br>ciation de l'éthanal bisulfite.                              | 0     | 0,59  | 1,11  | 1,75   |
| SO <sub>2</sub> total .....                                                                            | 6,48  | 7,07  | 7,59  | 8,23   |
| D° mesuré .....                                                                                        | 0,306 | 0,345 | 0,390 | 0,447  |
| SO <sub>2</sub> déduit de la mesure ....                                                               |       | 7,31  | 8,26  | 9,48   |
| Erreur en $\mu$ g SO <sub>2</sub> introduite<br>par la présence de la com-<br>binaison bisulfite ..... |       | 0,24  | 0,67  | 1,25   |
| Erreur en % .....                                                                                      |       | 3,4 % | 8,8 % | 15,2 % |

On voit d'après le tableau III que la combinaison éthanal bisulfite perturbe le dosage. Dans la zone d'emploi de cette méthode, on a une erreur de 5 p. 100 lorsqu'il y a autant de sulfite sous forme combinée que sous forme libre.

TABLEAU IV

*Oxydation du sulfite pendant la centrifugation.*

| N° | Traitement (1)           | SO <sub>2</sub> en $\mu$ g/ml | Pertes en % |
|----|--------------------------|-------------------------------|-------------|
| 1  | Non centrifugé           | 5,33                          |             |
| 2  | Centrifugé tube plein    | 5,16                          | 3,2 %       |
| 3  | Centrifugé tube mi-plein | 4,92                          | 7,7 %       |
| 4  | Non centrifugé           | 3,98                          |             |
| 5  | Centrifugé mi-plein      | 3,71                          | 6,8 %       |

(1) Solution de sulfite centrifugé 5 minutes à 4000 g en tubes droits non bouchés, de 5 ml de capacité.

Comme ce dosage colorimétrique a été fait sur des échantillons soumis à une centrifugation, on a voulu vérifier dans quelle mesure cette opération pouvait produire un départ ou une oxydation du sulfite. L'expérience rapportée dans le paragraphe suivant donne des précisions sur ce point.

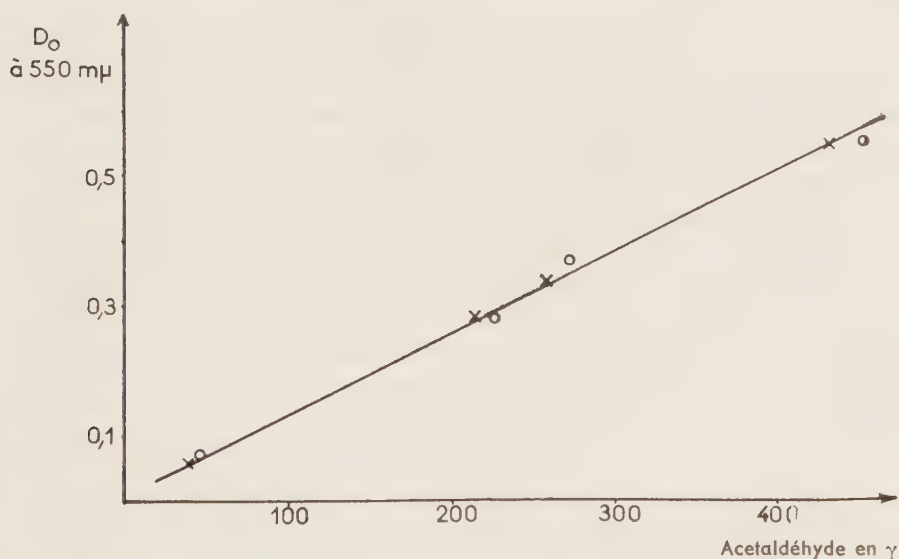
# OXYDATION DU SULFITE PENDANT LES OPÉRATIONS DE CENTRIFUGATION

Le dosage iodométrique des sulfites peut se faire à la rigueur en présence de corps microbiens qui agissent seulement en diminuant un peu la netteté du point de virage de l'empois d'amidon. La méthode colorimétrique doit obligatoirement éliminer les bactéries. Les résultats du tableau IV qui se rapportent à deux solutions pures de sulfite, indiquent que la centrifugation ne produit que des pertes peu importantes, lorsqu'on a soin de remplir les tubes où on la réalise.

Il y aura cependant intérêt à faire subir dans tous les cas la même centrifugation aux échantillons de référence et aux essais afin de compenser les erreurs que cette opération peut occasionner.

## b) Dosage de l'éthanal.

Les faibles concentrations d'éthanal qui peuvent se produire au cours de l'oxydation de l'éthanol en présence de sulfite ont été déterminées



GRAPHIQUE 3. — Courbe de référence pour le dosage de l'éthanal par la méthode de Fromageot et Heitz obtenue avec l'éthanal (x) et sa combinaison bisulfite (o).

avec la méthode de FROMAGEOT et HEITZ (32) qui utilisent la réaction colorée de Rimini.

A 6 ml d'une solution contenant 60 à 400  $\mu\text{g}$  d'éthanal, on ajoute 1,5 ml d'une solution saturée de pipérazine et 0,5 ml d'une solution de nitroprussiate de sodium à 4 p. 100. Après 2-3 minutes, la coloration bleue est maximum. Comme elle est instable on fait plusieurs mesures avec un filtre sélectif pour 560 m $\mu$ . On prend comme résultat la valeur de l'absorption maximum.

On a constaté que cette méthode dose à la fois l'éthanal libre et l'éthanal combiné au bisulfite.

Le graphique 3 représente deux courbes de références qui ont été construites à partir de solutions d'éthanal fraîchement distillé et de sel sodique de la combinaison bisulfite et les résultats ont été identiques. Les deux solutions ont été normalisées par oxydation chromique avec la même méthode que celle exposée pour le dosage de l'éthanol.

#### c) Dosage de l'acide acétique.

Puisque les solutions ne contiennent que de l'acide acétique comme acide volatil, les dosages se font directement après entraînement à la vapeur d'eau, dans l'appareil décrit par JAULMES (45). Les prises d'essais peuvent varier de 1 à 20 ml suivant la teneur en acide. On titre par la soude 0,1 N en présence de phénolphthaléine. Pour une prise d'essai de 20 ml, il est nécessaire de recueillir 250 ml pour entraîner tout l'acide acétique. Pour 1 ml, il suffit d'en recueillir 50.

#### d) Dosage de l'éthanol.

Le dosage après distillation a été exécuté par oxydation chromique en tenant compte des remarques faites par CORDEBAR (19). La solution de bichromate de potassium est faite dans l'acide sulfurique à 50 p. 100. La prise d'essai contenant l'alcool est égale au cinquième du volume du bichromate. Après 10 minutes de contact à température du laboratoire, le mélange est dilué 20 fois et le bichromate qui n'a pas oxydé l'alcool, mis en présence d'un excès d'iodure de potassium, libère une quantité équivalente d'iode, qui est titrée à l'hyposulfite en présence d'empois d'amidon. Les calculs sont faits à partir d'une prise témoin de bichromate, titrée exactement dans les mêmes conditions.

#### e) Dosage de l'azote.

Pour l'azote total, nous avons utilisé la méthode de LUBOCHINSKY et ZALTA (56) sans aucune modification.

#### f) Appareillage.

Les mesures de pH ont été réalisées avec l'électrode de verre et l'appareil MECI type PV. La standardisation se faisait à partir d'une solution saturée à 20° de tartrate acide de potassium, dont le pH est égal à 3,56.

Pour les mesures colorimétriques, on a utilisé le colorimètre Lumetron et les tubes calibrés 13 × 130 mm fournis par le constructeur. Les spectres ont été tracés avec le spectrophotomètre enregistreur Cary, modèle 14, utilisant des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur.

### CHAPITRE III

## ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL ET DE SON INHIBITION PAR LE SULFITE

La transformation de l'éthanol en acide acétique a déjà donné lieu à de nombreuses études réalisées soit avec des bactéries non proliférantes, soit avec des poudres acétoniques et plus récemment avec des extraits enzymatiques. Il est cependant utile de préciser, dans le cas de la souche que nous avons utilisée, les conditions optimum et les limites de cette réaction. Jusqu'ici la plupart des études avaient été faites dans des milieux dont le pH était voisin de 7. Comme notre but est d'étudier l'inhibition par l'acide sulfureux, qui est particulièrement nette en milieu acide, il est indispensable de rechercher le tampon qui peut le mieux convenir à cet usage. Nous avons aussi étudié la vitesse de réaction en fonction du pH et de la concentration en éthanol. Cette réaction étant bien définie, nous avons cherché à démontrer qu'elle est inhibée par l'acide sulfureux. Notre étude nous a conduit à montrer la réversibilité de l'inhibition, à étudier sa nature et à rechercher comment elle varie en fonction de la durée de l'incubation et du pH du milieu.

### I. — Oxydation de l'éthanol.

#### a) Choix d'un tampon.

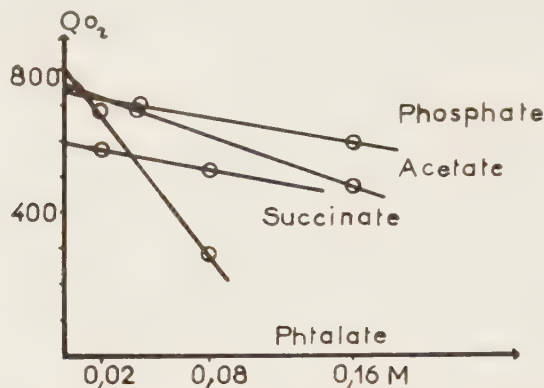
Nous avons cherché un tampon efficace dans la large zone de pH que nous désirions utiliser. On sait en effet, que l'action de l'acide sulfureux varie considérablement avec l'acidité du milieu, on sera donc amené à l'essayer dans des conditions très différentes. Le pH minimum utilisé dans notre travail est celui compatible avec une certaine activité oxydante des bactéries. C'est ainsi qu'un pH de 2,6 représente pour la souche employée des conditions biologiques acceptables, puisque la respiration est encore la moitié de ce qu'elle est à l'optimum. Le pH maximum correspond à celui pour lequel l'acide sulfureux ne possède presque plus d'action inhibitrice : il est voisin de la neutralité.

Voici les divers tampons habituellement utilisés susceptibles de répondre à cette condition (36) :

|                                      |       |              |
|--------------------------------------|-------|--------------|
| Tampon citrate .....                 | 0,1 M | pH 3,0 à 6,2 |
| Tampon acétate .....                 | 0,2 M | pH 3,6 à 5,6 |
| Tampon succinate .....               | 0,2 M | pH 3,8 à 6,0 |
| Tampon phtalate .....                | 0,2 M | pH 2,2 à 6,0 |
| Tampon citrate-phosphate (McIlvaine) |       | pH 2,6 à 7,0 |

Ces deux derniers tampons sont les plus avantageux. Il reste à vérifier s'ils ne sont pas toxiques pour les bactéries et si on peut les employer à une concentration suffisante.

Le graphique 4 montre l'influence de la concentration de ces divers tampons sur l'oxydation de l'éthanol. Les tampons ont été ajustés à



GRAPHIQUE 4. — Influence de la concentration de divers tampons sur l'oxydation de l'éthanol. Respiration mesurée par la technique de WARBURG. Atmosphère : air. Température 30°, pH  $3,8 \pm 0,02$ . Mélange réactionnel = Bactéries 0,25 mg/ml. Éthanol 0,04 M. Volume final 2,5 ml. Résultats exprimés en  $\mu$  l.  $O_2$ /mg. h.

pH 3,8 avec une précision de  $\pm 0,02$  unités. On a aussi introduit dans cette série de tampons, une solution de phosphate monopotassique et acide phosphorique portée au même pH, bien qu'elle ne présente aucune capacité tampon.

TABLEAU V

*Respiration d'A. rancens dans le tampon Mc Ilvaine.*

|   | Substrat            | pH  | Concentration du tampon<br>exprimée en fonction de<br>$PO_4 \equiv$ | $QO_2$ |
|---|---------------------|-----|---------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 | eau.....            | 5,8 | 0                                                                   | 4,3    |
| 2 | eau.....            | 6,8 | 0,066 M                                                             | 4,7    |
| 3 | eau.....            | 3,8 | 0,028 M                                                             | 0      |
| 4 | éthanol 0,04 M..... | 3,8 | 0,056 M                                                             | 513    |
| 5 | éthanol 0,04 M..... | 3,8 | 0,014 M                                                             | 560    |

Respiration mesurée par la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Mélange réactionnel. Bactéries 0,86 mg dans les fioles (1, 2, 3) et 0,58 mg dans les fioles 4 et 5. Volume final 2,5 ml. Résultats exprimés en  $\mu$  l.  $O_2$ /mg. h.

Il ressort de ces essais que les divers tampons employés produisent tous à pH 3,8 une certaine inhibition de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter*. Le phthalate se montre fortement toxique et ne peut être retenu. Les autres le sont beaucoup moins, mais il est cependant préférable de les utiliser à faible concentration. On a choisi pour cette étude

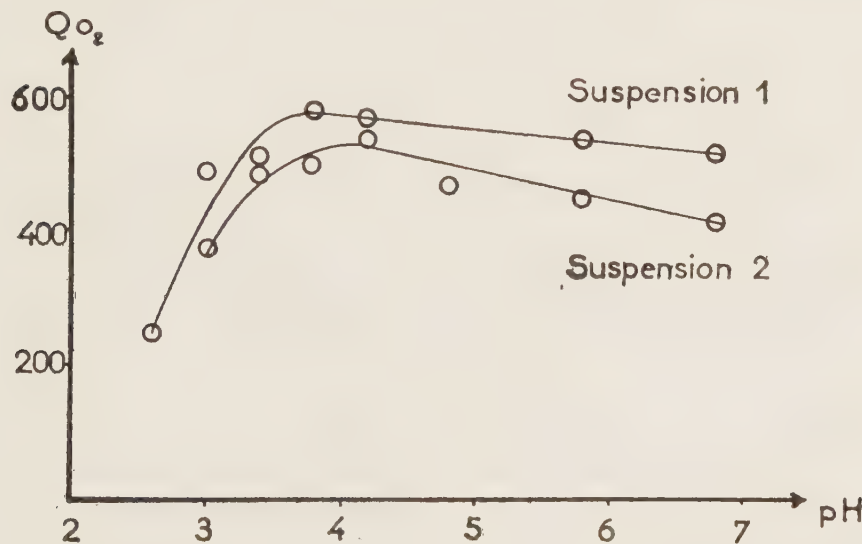
le tampon acide citrique phosphate de Mc Ilvaine, qui est parmi les moins toxiques ainsi que le démontrent les résultats rapportés dans le tableau V.

Il permet en outre de couvrir toute l'échelle des pH intéressants. On a vérifié que les bactéries sont incapables d'oxyder l'acide citrique dans les conditions où se font les mesures. La respiration endogène qui est faible à pH 6,8 n'est plus décelable à pH 3,8.

Le tampon Mc Ilvaine présente un inconvénient : la concentration ionique varie beaucoup avec le pH, puisqu'on le réalise avec une solution d'acide citrique 0,1 M et du phosphate disodique 0,2 M. C'est pourquoi dans les indications expérimentales que nous serons amenés à donner, nous indiquerons la concentration du phosphate dans chaque expérience.

#### b) Action du pH et de la concentration en éthanol.

Avec deux préparations différentes de bactéries non proliférantes, on a déterminé la vitesse d'oxydation de l'éthanol pour une zone de pH s'étendant de 2,6 à 6,8.

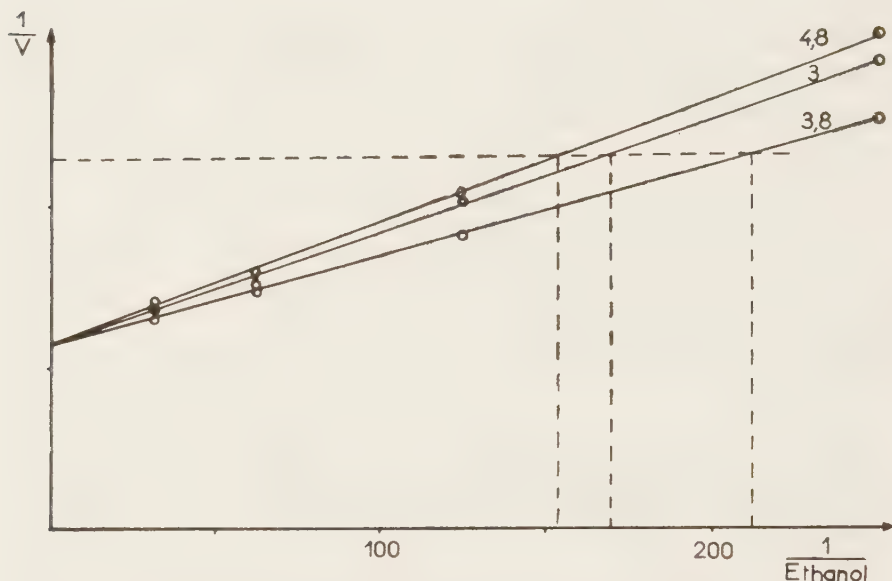


GRAPHIQUE 5. — Vitesse d'oxydation de l'éthanol en fonction du pH. Respiration mesurée par la technique de WARBURG. Atmosphère : air. Température, 30°. Mélange réactionnel : Bactéries 0,33 mg/ml (suspension 1) et 0,30 mg/ml (suspension 2). Éthanol 0,04 M. Tampon Mc Ilvaine pH 2,6 à 6,8 avec concentration en  $\text{PO}_4 \equiv$  de 0,0086 M à 0,065 M suivant le pH. Résultats exprimés en  $\mu \text{ l. O}_2/\text{mg h.}$

Les résultats reproduits sur le graphique 5 montrent que dans les deux cas le pH optimum est compris entre 3,8 et 4,2. Il est intéressant de noter que cette réaction se montre peu sensible au pH neutre et qu'elle se poursuit encore avec une vitesse appréciable à pH 2,6. Les bactéries utilisées conviennent donc bien pour permettre d'étudier l'inhibition par le sulfite en milieu acide.

On a remarqué que la vitesse maximum de l'oxydation de l'éthanol varie avec sa concentration et on a cherché à voir dans quelle mesure le pH peut agir sur ce phénomène. Pour ce faire, les vitesses initiales de l'oxydation de l'éthanol, à diverses concentrations, et à divers pH, ont été déterminées.

Le graphique 6 indique qu'il existe une relation linéaire entre l'inverse de la concentration en éthanol et l'inverse de la vitesse de réaction, le



GRAPHIQUE 6. — Influence de la concentration en éthanol sur la vitesse de réaction.

Respiration mesurée par la technique micromanométrique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Mélange réactionnel. Bactéries 0,36 mg/ml. Tampon Mc Ilvaine pH 3 ; 3,8 ; 4,8 ; concentrations en  $\text{PO}_4 \equiv 0,017 ; 0,029 ; 0,041 \text{ M}$ .

Abscisse inverse de la concentration moléculaire en éthanol. Ordonnée inverse de la vitesse en unités arbitraires.

phénomène est donc susceptible d'être interprété par la théorie de l'absorption de LANGMUIR (53).

Il est alors possible de déterminer graphiquement une constante apparente de dissociation pour le complexe bactérie-éthanol.

On a obtenu les valeurs suivantes qui correspondent à trois pH différents :

|      |               |                                            |
|------|---------------|--------------------------------------------|
| pH 3 | 3             | K apparent = 5,9 $\cdot 10^{-3} \text{ M}$ |
| —    | 3,8 (optimum) | — 4,7 —                                    |
| —    | 4,8           | — 6,5 —                                    |

L'existence de cette constante rend compte de deux faits : d'abord de ce que le substrat donne avec la bactérie une combinaison dissociable dans laquelle n'intervient qu'une seule molécule de substrat et ensuite de ce que la vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration en éthanol.

On est en droit de penser que les points de réaction de l'éthanol sur

les bactéries sont facilement accessibles, soit qu'ils se trouvent localisés sur la membrane, soit que cette dernière possède une très grande perméabilité. En effet lorsqu'on détermine la constante apparente de dissociation de l'éthanol et de l'extrait enzymatique, on obtient des valeurs très voisines. C'est ainsi que pour deux déterminations sur l'extrait, on a obtenu à pH 3,8 ; 5,1 et 5,4  $10^{-3}$  M alors qu'on obtenait 4,7  $10^{-3}$  M avec des bactéries au même pH. Une constatation analogue a déjà été faite par HESTRIN (40) en ce qui concerne l'invertase des levures. Cet auteur a conclu de l'identité des constantes de dissociation que l'enzyme est proche de la surface cellulaire.

Lorsqu'on considère l'action du pH sur la réaction, on remarque qu'elle est différente de celle que l'on est habitué à trouver pour les systèmes enzymatiques. La courbe d'activité en fonction du pH n'est pas une courbe en cloche symétrique par rapport à l'optimum. Elle ne peut donc être expliquée par la dissociation de la protéine enzymatique qui donnerait naissance à des formes inactives de la molécule. Ce comportement particulier envers le pH n'est pas unique en son genre. Dans le cas de la levure, le système enzymatique responsable de l'oxydation du glucose est aussi à peu près indépendant du pH entre 3,5 et 8.

Les résultats tels qu'ils sont représentés sur le graphique 6, indiquent que le changement de pH agit, comme s'il introduisait dans le système réactionnel un inhibiteur compétitif. Le pH optimum est celui pour lequel la constante d'équilibre mesurée est la plus faible. Par analogie avec ce qui se passe dans une inhibition compétitive, on peut interpréter ce résultat en admettant que le pH intervient pour rendre impossible la fixation de l'éthanol sur les centres actifs de la bactérie possédant un certain état d'ionisation, de la même façon que l'inhibiteur compétitif rend impossible la fixation du substrat, lorsqu'il est combiné à l'enzyme.

## II. — Inhibition de l'oxydation de l'éthanol par l'acide sulfureux.

Les conditions expérimentales qui ont été choisies pour étudier ce point particulier ont nécessité quelques expériences préalables destinées à montrer leur validité. Les mesures se faisant dans l'appareil de Warburg en aérobiose, il est indispensable de vérifier ce que devient le sulfite, de rechercher dans quelle mesure il s'oxyde et si cette réaction n'introduit pas d'erreur importante dans la mesure de l'absorption d'oxygène.

### a) Oxydation du sulfite au cours des expériences.

Le sulfite peut se transformer en sulfate par oxydation, ou bien se fixer sur la potasse contenue dans la tubulure centrale des fioles de Warburg, comme le fait l'acide cyanhydrique. La première réaction diminue

de vitesse à mesure que le milieu devient plus acide, alors que l'augmentation d'acidité augmente la tension de vapeur de l'anhydride sulfureux dans ses solutions et facilite sa fixation sur la potasse.

TABLEAU VI

*Disparition de l'acide sulfureux pendant les expériences  
faites dans l'appareil de Warburg.*

|                                                                                | SO <sub>2</sub> en $\mu$ mol./ml. |      |      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|------|------|
| 1° Tampon phosphate pH 6 : 0,05 M                                              | —                                 |      |      |      |
| SO <sub>2</sub> au début de l'expérience.....                                  | 1,87                              |      |      |      |
| après 70 minutes d'agitation :                                                 |                                   |      |      |      |
| fiolle sans KOH.....                                                           | 0,83                              |      |      |      |
| fiolle avec KOH.....                                                           | 0,46                              |      |      |      |
| 2° Tampon Mc Ilvaine pH 3,8. Concentration en PO <sub>4</sub> $\equiv$ 0,035 M |                                   |      |      |      |
| SO <sub>2</sub> au début de l'expérience (1).....                              | 3,70                              | 3,75 | 1,56 | 1,54 |
| après 35 minutes d'agitation :                                                 |                                   |      |      |      |
| fiolle sans KOH.....                                                           | 2,01                              | 2,52 | 0,84 | 1,05 |
| fiolle avec KOH.....                                                           | 2,05                              | 2,23 | 0,86 | 0,93 |

(1) Expérience répétée 4 fois. Atmosphère : air. Température 30°. Volume total 2,4 ml.  
SO<sub>2</sub> déterminé par la méthode de Grant.

Le tableau VI donne les résultats de deux séries d'expériences faites à pH 6 et pH 3,8. Des solutions de sulfite à des concentrations légèrement supérieures à celles que nous avons utilisées par la suite, ont été agitées dans des fioles de Warburg contenant ou ne contenant pas de la potasse,

TABLEAU VII

*Comparaison de la respiration et de la respiration endogène  
en présence et en l'absence de l'acide sulfureux.*

|                                             | QO <sub>2</sub> |                |
|---------------------------------------------|-----------------|----------------|
|                                             | Sans substrat   | Éthanol 0,05 M |
| SO <sub>2</sub> seul.....                   | 4               | —              |
| Bactéries.....                              | 18              | 596            |
| Bactéries + SO <sub>2</sub> .....           | 17              | 17             |
| Bactéries bouillies + SO <sub>2</sub> ..... | 17              | 15             |

Bactéries 0,65 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon McIlvaine pH 3,8 concentration en PO<sub>4</sub>  $\equiv$  0,032 M. Sulfite 1,5  $\mu$  mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère: air. Température 30°. Volume final 2,1 ml. Résultats exprimés en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>/mg. h.

et le sulfite a été dosé colorimétriquement au début et à la fin de l'expérience. On voit que la diminution de la concentration en sulfite est loin d'être négligeable même à pH 3,8. En revanche, à ce pH, le phénomène de migration sur la potasse est peu marqué. On constate des disparitions variables d'une fiole à l'autre. L'oxydation du sulfite, qui est d'après nos expériences la cause prépondérante de sa disparition, ne peut cependant pas donner d'erreur importante dans la mesure de l'oxygène absorbé. Elle se produit surtout pendant les 10 minutes où se réalise l'équilibre

des températures, et qui précèdent toujours le début des mesures. Par la suite, elle devient très faible comme le montrent les résultats du tableau VII et complètement négligeable devant la respiration des bactéries.

*b) Avantage d'une incubation en présence d'acide sulfureux.*

Il n'est pas possible d'obtenir des résultats reproductibles lorsqu'on introduit l'inhibiteur dans la fiole de Warburg avant de faire les mesures. Ceci ne nous surprend pas, puisqu'on a remarqué que le sulfite disparaissait avec des vitesses différentes d'une fiole à l'autre. Pour éviter cet inconvénient, il est donc indispensable de faire une incubation préalable des bactéries en présence de sulfite. Nous l'avons réalisée à la température de 30°, dans des tubes à essais pleins, obturés par un bouchon de caoutchouc. Dans ces conditions, l'oxydation est faible ainsi qu'on peut s'en rendre compte dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

*Disparition de l'acide sulfureux au cours de l'incubation.*

|                                                 | Temps d'incubation<br>en heures | Témoin | Avec bactéries | Avec bactéries<br>+ éthanol |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|--------|----------------|-----------------------------|
| SO <sub>2</sub> libre dans le liquide . . . . . | 0                               | 0,780  | 0,692          | 0,519                       |
|                                                 | 2,5                             | 0,788  | 0,615          | 0,353                       |
|                                                 | 3,5                             | 0,730  | 0,570          | 0,303                       |
|                                                 | 5,5                             | 0,704  | 0,475          | 0,209                       |
| SO <sub>2</sub> combiné dans le liquide . .     | 0                               | 0      | 0,006          | 0,141                       |
|                                                 | 2,5                             | 0      | 0,023          | 0,310                       |
|                                                 | 3,5                             | 0      | 0,057          | 0,312                       |
|                                                 | 5,5                             | 0,015  | 0,043          | 0,298                       |

25 ml du mélange mis en incubation à 30° dans des tubes à essais. Dosage iodométrique de SO<sub>2</sub> libre et combiné dans le liquide après centrifugation. SO<sub>2</sub> exprimé en  $\mu$  mol/ml, tampon Mc Ilvaine, pH 3,8 PO<sub>4</sub>  $\equiv$  0,028 M, bactéries 0,43 mg/ml, éthanol 0,04 M.

Lorsque les bactéries sont mises en incubation en l'absence d'éthanol, le sulfite libre diminue, sans qu'on le retrouve combiné. Deux explications sont possibles, ou bien les bactéries catalysent son oxydation, ou bien il se combine avec les corps bactériens et échappe aux dosages à cause de la centrifugation préalable qui l'élimine en même temps que les bactéries. L'impossibilité de doser le sulfate, même avec une méthode sensible comme celle de DOGSON et SPENCER (22), dans une solution aussi diluée et contenant des phosphates, ne nous a pas permis de mettre en évidence l'une ou l'autre des raisons de la disparition du sulfite. Cette question sera résolue par l'emploi du sulfite radioactif comme on le verra dans la suite.

Lorsqu'on met en incubation les bactéries avec du sulfite en présence

d'éthanol, on constate l'apparition de quantités importantes de sulfite combiné. Ces résultats apparaissent dans le tableau VIII. Comme un dosage a mis aussi en évidence la présence d'éthanal à la dose de 0,5  $\mu$  mol/ml, on doit admettre que le sulfite est lié à l'éthanal dans une combinaison bisulfitique. On a donc retrouvé à un pH de 3,8 une capture de l'éthanal par le sulfite analogue à celle que NEUBERG (63) avait mise en évidence en milieu neutre.

### c) Conditions de l'incubation.

Les conditions dans lesquelles se fait l'incubation en présence de sulfite, doivent être normalisées pour obtenir des résultats reproductibles. Le temps de contact est extrêmement important, comme le montre le tableau IX.

TABLEAU IX

*Influence de la durée d'incubation.*

| Durée de l'incubation | Inhibition %            |                        |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|
|                       | Bactéries<br>0,22 mg/ml | Bactéries<br>1,1 mg/ml |
| 15 minutes .....      | 100                     | 26                     |
| 180 minutes .....     | 100                     | 100                    |

Bactéries mises en incubation à 30° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8 concentration en  $\text{PO}_4 \equiv 0,028$  M. Sulfite 0,59  $\mu$  mol/ml Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Éthanol 0,04 M. Volume final 2 ml et 0,4 ml pour la plus forte concentration en bactéries. Résultats exprimés en pourcentage d'inhibition.

Des temps trop longs produisent non pas une inhibition mais une action bactéricide ainsi que nous avons pu nous en rendre compte dans

TABLEAU X

*Influence de l'éthanol pendant l'incubation.*

|                                       | Q $\text{O}_2$ | Inhibition |
|---------------------------------------|----------------|------------|
| Bactéries sans $\text{SO}_2$ .....    | 493            | —          |
| Bactéries avec $\text{SO}_2$          |                |            |
| éthanol ajouté avant incubation ..... | 491            | 0          |
| — — après — .....                     | 311            | 37 %       |

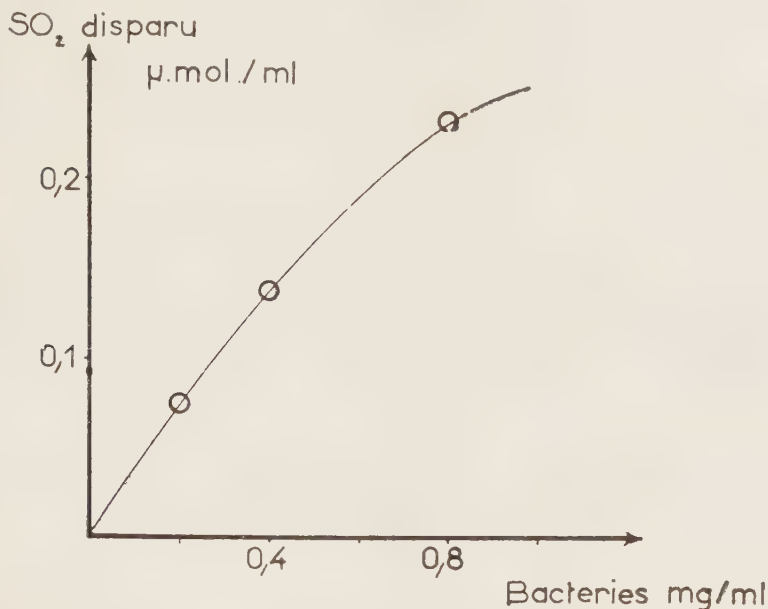
Bactéries 0,62 mg/ml mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en  $\text{PO}_4 \equiv 0,028$  M. Sulfite 0,3  $\mu$  mol/ml. Éthanol 0,04 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Résultats exprimés en  $\mu\text{l O}_2/\text{mg. h.}$

d'autres expériences (24). Afin de rester dans la zone des phénomènes réversibles, nous avons limité, par la suite, la durée d'incubation de 15 à 30 minutes.

L'expérience décrite dans le tableau X montre que la concentration en sulfite rapportée à la masse bactérienne n'est pas indifférente au résultat de l'inhibition. Pour une même dose de sulfite, l'inhibition diminue lorsque la concentration en bactéries augmente.

Les résultats représentés par le graphique 7 permettent de constater que la quantité de sulfite disparu est d'autant plus forte qu'il y a davantage de bactéries.

L'expérience rapportée sur le tableau X montre aussi que l'éthanol exerce pendant l'incubation avec le sulfite une action protectrice qui



GRAPHIQUE 7. — Influence de la concentration en bactéries sur la disparition du sulfite pendant l'incubation.

Incubation de 250 minutes à 30° dans le tampon Mc Ilvaine, pH 3,8, concentration en  $\text{PO}_4 = 0,028$  M. Sulfite 0,67  $\mu$  mol/ml. Sulfite déterminé par iodométrie après centrifugation.

est complète dans ce cas. Il y a donc intérêt à éviter la présence du substrat au cours de l'incubation.

#### d) Bilan de l'oxydation de l'éthanol en l'absence et en présence d'acide sulfureux.

Il est difficile d'effectuer les analyses sur les faibles quantités mises en jeu dans les manomètres de Warburg. Aussi avons-nous fait les expériences dans des ballons de 600 ml contenant 45 ml de liquide, bouchés et agités. L'oxygène contenu dans le ballon soit  $(600-45) \times 0,208 = 115$  ml suffit à transformer plus de 5000  $\mu$  molécules d'éthanol, il représente donc un gros excès par rapport aux 1620  $\mu$  molécules qui ont été utilisées dans l'expérience rapportée au tableau XI.

Le bilan a été fait sur des bactéries non traitées et sur des bactéries inhibées par le sulfite. Dans les deux cas on voit que les molécules d'éthanol disparu correspondent aux molécules d'acide apparu. Avec les bactéries inhibées par le sulfite, on décèle la formation de quantités très

faibles d'éthanal. Le pourcentage d'inhibition a été calculé à partir des dosages chimiques et de la détermination du  $Q\ O_2$  faite par la méthode de Warburg. On constate que les deux résultats sont en bonne concor-

TABLEAU XI

*Bilan de l'oxydation de l'éthanol  
en absence et en présence d'acide sulfureux.*

| $\mu$ mol par ml.     | Sans $SO_2$ | Avec $SO_2$ | Inhibition % |
|-----------------------|-------------|-------------|--------------|
| éthanol disparu ..... | — 34,0      | — 25,75     |              |
| acide formé .....     | + 34,5      | + 26,0      | 24,6         |
| éthanal formé .....   | + 0,03      | + 0,10      |              |
| $Q\ O_2$ (1) .....    | 1220        | 873         | 28,5         |

(1) Mesuré au Warburg sur une partie aliquote. Atmosphère : air. Température 30°. Bactéries 0,64 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8, concentration en  $PO_4 \equiv 0,028$  M. Sulfite 0,17  $\mu$  mol/ml.

Bilan effectué sur 45 ml de ce mélange contenant 36  $\mu$  mol/ml d'éthanol. Agitation à 35° pendant 4 heures.

dance. L'identification de l'acide formé au cours de ces réactions a été faite par la méthode de Duclaux : 33 ml de l'acide déjà entraîné à la vapeur d'eau sont distillés et recueillis par fractions de 10 ml.

TABLEAU XII

*Identification de l'acide produit.*

| Volume distillé | Pourcentage d'acidité recueillie |                         |                                 |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
|                 | Échantillon sans $SO_2$          | Échantillon avec $SO_2$ | Théorique pour l'acide acétique |
| 10              | 26,8                             | 26,3                    | 26                              |
| 20              | 57,4                             | 56,9                    | 56,6                            |
| 30              | 100                              | 100                     | 100                             |

Les résultats du tableau XII indiquent le pourcentage d'acide distillé dans chaque fraction pour les deux échantillons et on constate qu'il correspond à ce que donnent les tables pour l'acide acétique.

Ces expériences démontrent que dans les conditions que nous avons choisies, la seule réaction produite par les bactéries est l'oxydation de l'éthanol en acide acétique. L'acide acétique n'est pas métabolisé et l'éthanal n'est présent qu'à l'état de traces. La réaction est exactement la même lorsqu'elle se fait en présence de sulfite, seule son intensité diminue.

## e) Inhibition par l'acide sulfureux.

Les conditions expérimentales ayant été définies, nous nous sommes attaché à démontrer que l'acide sulfureux est bien un inhibiteur de l'oxydation de l'éthanol par *A. rancens*.

Pour cela, on a utilisé trois préparations différentes provenant de la même culture. D'abord les bactéries non proliférantes, puis les granules et enfin l'extrait enzymatique qui en dérivent. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

*Comparaison de l'inhibition sur diverses préparations.*

|                         | SO <sub>2</sub><br>μ mol/ml | QO <sub>2</sub> | inhibition<br>% | μ mol SO <sub>2</sub> /ml. | Activité inhibée<br>μl O <sub>2</sub> /h |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|------------------------------------------|
|                         |                             |                 |                 | mg matière sèche           | μ mol SO <sub>2</sub> /ml.               |
| Bactéries 0,26 mg/ml    | 0                           | 759             | —               | —                          | —                                        |
|                         | 0,4                         | 558             | 26,5            | 1,54                       | 131                                      |
|                         |                             |                 | 50              | 2,05                       | 185                                      |
| Granules 1,54 mg/ml     | 0,8                         | 31              | 96              | 3,08                       | 236                                      |
|                         | 0                           | 187             | —               | —                          | —                                        |
|                         | 0,4                         | 90              | 52              | 0,26                       | 373                                      |
| Extrait clair 6,1 mg/ml |                             |                 | 50              | 0,24                       | 390                                      |
|                         | 0,8                         | 28              | 85              | 0,52                       | 307                                      |
|                         | 0                           | 52              | —               | —                          | —                                        |
| Extrait clair 6,1 mg/ml | 0,4                         | 27              | 48              | 0,065                      | 381                                      |
|                         |                             |                 | 50              | 0,07                       | 372                                      |
|                         | 0,8                         | 17              | 67              | 0,013                      | 267                                      |

Préparations mises en incubation 30 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en PO<sub>4</sub> ≡ 0,028 M.

Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°.

Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en μl. O<sub>2</sub>/mg. h.

Les valeurs soulignées sont obtenues par interpolation.

On a choisi à l'avance deux concentrations différentes en sulfite : 0,4 et 0,8 μ mol/ml et pour obtenir des inhibitions voisines, on a augmenté, lorsqu'on passait des bactéries aux granules et à l'extrait, la masse du produit utilisé. Pour comparer plus facilement les résultats, on a calculé par interpolation entre les résultats expérimentaux, la dose de sulfite qui produirait sur les trois préparations une inhibition de 50 p. 100. Ce mode de calcul implique que dans les limites où on l'applique, l'inhibition est proportionnelle à la concentration en inhibiteur. Les expériences représentées sur le graphique 8, montrent que ce mode de calcul est valable lorsque l'inhibition est voisine de 50 p. 100. L'approximation est sûrement très bonne dans le cas des granules et de l'extrait, où l'on a des valeurs de l'inhibition très proches de 50 p. 100. Dans le cas des bactéries, l'erreur est vraisemblablement plus forte, mais la valeur obtenue garde une signification intéressante. On a calculé dans l'avant der-

nière colonne du tableau XIII, pour chaque expérience, le rapport des  $\mu$ . molécules d'acide sulfureux au poids en mg de substance biologique (bactéries, granules, extrait) utilisée. Lorsqu'on considère l'inhibition à 50 p. 100, la quantité de  $\text{SO}_2$  nécessaire pour l'obtenir varie de 2,05  $\mu$  mol mg pour les bactéries, à 0,07 pour l'extrait. La dernière colonne de ce tableau, représente le rapport de l'activité inhibée à la concentration en acide sulfureux nécessaire pour la réaliser. Dans le cas de l'expérience sur les bactéries où l'on a obtenu une inhibition de 26,5 p. 100, le calcul est le suivant, si on rapporte tout au ml.

$$\frac{759 - 558 \times 0,26}{0,4} = 131 \frac{\mu \text{ l } \text{O}_2/\text{heure}}{\mu \text{ mol. } \text{SO}_2}$$

On constate alors que pour une inhibition de 50 p. 100, cette valeur est à peu près constante lorsqu'on passe des granules à l'extrait. Pour les bactéries, l'ordre de grandeur est respecté. Ce calcul montre donc qu'il semble exister, quelle que soit la préparation, une relation entre la concentration en acide sulfureux que l'on réalise et la valeur absolue de l'activité inhibée.

Nous avons voulu confirmer ce résultat par une autre expérience destinée à démontrer que l'addition de bactéries dépourvues d'activité enzymatique ne modifie pas d'une façon sensible l'inhibition.

TABLEAU XIV

*Influence des bactéries inactives sur l'inhibition.*

|                                    | Q $\text{O}_2$ <sup>(1)</sup> | Inhibition |
|------------------------------------|-------------------------------|------------|
| Bactéries :                        |                               |            |
| sans $\text{SO}_2$ .....           | 600                           |            |
| avec $\text{SO}_2$ .....           | 420                           | 30 %       |
| Bactéries + bactéries inactivées : |                               |            |
| sans $\text{SO}_2$ .....           | 619                           |            |
| avec $\text{SO}_2$ .....           | 390                           | 37 %       |

Bactéries 0,37 mg/ml mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8  
concentration en  $\text{PO}_4 \equiv 0,028$  M. Sulfite 0,31  $\mu$  mol/ml Bactéries inactivées par ébullition 0,37 mg/ml.  
Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol  
0,05 M. Résultats exprimés en  $\mu$  l.  $\text{O}_2$ /mg. h.

(1) Q  $\text{O}_2$  calculé sans tenir compte des bactéries inactives.

Le tableau XIV contient les résultats d'une expérience où l'on a réalisé une inhibition de 30 p. 100. L'expérience répétée avec une suspension contenant en plus une quantité égale de bactéries inactivées par l'ébullition ne modifie pas significativement le taux d'inhibition que l'on retrouve égal à 37 p. 100.

Ces deux expériences démontrent que le sulfite réagit bien sur le système responsable de l'oxydation de l'éthanol, puisque la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition donnée est proportionnelle à l'activité que l'on veut inhiber.

## INHIBITION DE L'OXYDATION DE DIVERS SUBSTRATS.

Outre l'éthanol, les bactéries acétiques peuvent aussi oxyder d'autres substrats. L'espèce que nous avons utilisée, *A. rancens*, peut notamment attaquer l'éthanal, l'acide lactique et le glucose. On a donc recherché si l'inhibition par le sulfite se retrouvait pour l'oxydation de ces substrats. Le tableau XV donne les résultats d'une expérience dans laquelle on a mesuré, en présence de divers substrats, le taux d'inhibition de la respiration de bactéries ayant subi une incubation en présence d'acide sulfureux. Il apparaît que le taux d'inhibition obtenu est différent suivant que l'on considère l'un ou l'autre substrat. Lorsqu'on calcule le rapport entre l'activité inhibée et la concentration en sulfite, de la même façon que dans la dernière colonne du tableau XIII, on trouve qu'il est à peu près constant pour trois substrats. Seul le glucose fait exception, mais dans ce cas le calcul n'est plus valable, car on aurait peut-être pu obtenir une inhibition complète avec une dose d'inhibiteur bien plus petite. Ceci vient renforcer les conclusions tirées des expériences précédentes et établit que l'acide sulfureux réagit spécifiquement avec les systèmes enzymatiques.

TABLEAU XV

*Inhibition de l'oxydation de divers substrats.*

| Substrat          | QO <sub>2</sub>      |                      |              |                        |
|-------------------|----------------------|----------------------|--------------|------------------------|
|                   | Sans SO <sub>2</sub> | Avec SO <sub>2</sub> | Inhibition % | QO <sub>2</sub> inhibé |
| Ethanol .....     | 660                  | 294                  | 55 %         | 366                    |
| Ethanal .....     | 870                  | 514                  | 41 %         | 356                    |
| Lactate de Na.... | 376                  | 40                   | 89 %         | 336                    |
| Glucose .....     | 78                   | 0                    | 100 %        | 78                     |

Bactéries 0,20 mg/ml mises en incubation 20 minutes à 30° dans un tampon Mc Ilvaine. pH 3,8 concentration en PO<sub>4</sub>≡ 0,028 M. Sulfite 0,4 μ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Substrat 0,05 M. Résultats exprimés en μl O<sub>2</sub>/mg.h.

## INFLUENCE DU PH.

L'inhibition de l'oxydation de l'éthanol par l'acide sulfureux a été étudiée en fonction du pH. Les mesures ont été faites dans une échelle de pH s'étendant de 3 à 4,2. Il n'a pas été possible de les continuer dans des milieux moins acides, car intervient alors d'une façon prépondérante un mode d'inhibition différent : à savoir la capture de l'éthanal par le bisulfite. Dans ces conditions, en augmentant la dose de sulfite on ne peut obtenir qu'une inhibition de 50 p. 100 pour la raison que nous exposerons dans la discussion.

Le tableau XVI présente les résultats d'une série d'essais où l'inhibi-

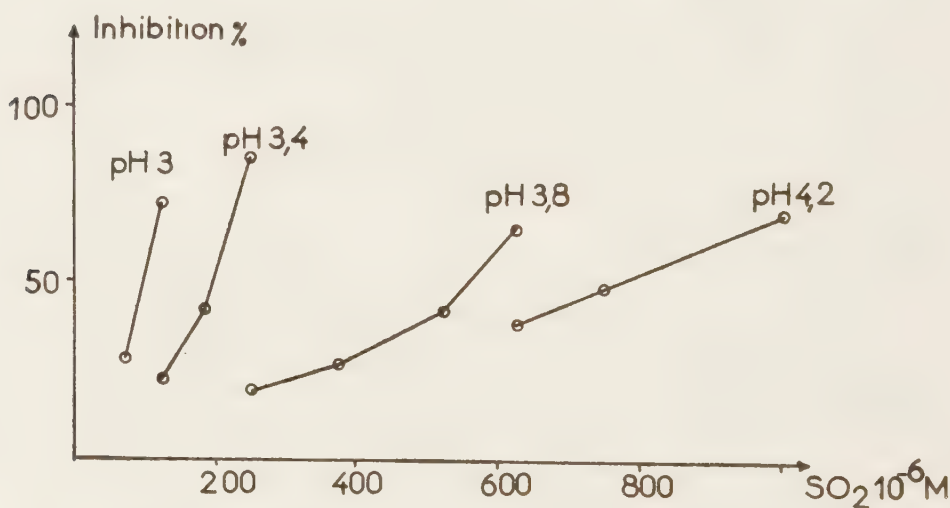
tion a été réalisée à divers pH avec des doses croissantes de sulfites. Les essais sont comparables entre eux, puisque les bactéries proviennent de la même récolte et que la quantité utilisée est la même dans chaque expérience. Ce dernier point est important puisqu'une expérience précédente nous a démontré que l'inhibition dépend, non seulement de la concen-

TABLEAU XVI

*Variations de la respiration ( $Q\ O_2$ )  
sous l'influence combinée du pH et de l'acide sulfureux.*

| pH<br>↓ | QO <sub>2</sub> → | SO <sub>2</sub> en μ mol/l. |    |     |       |     |     |     |     |     |      |
|---------|-------------------|-----------------------------|----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|         |                   | 0                           | 75 | 125 | 187,5 | 250 | 375 | 525 | 625 | 750 | 1000 |
| 3       | 237               | 167                         | 60 | 173 | 60    | 344 | 310 | 247 | 147 | 189 | 113  |
| 3,4     | 302               |                             |    |     |       |     |     |     |     |     |      |
| 3,8     | 426               |                             |    |     |       |     |     |     |     |     |      |
| 4,2     | 362               |                             |    |     |       |     |     |     |     |     |      |

Bactéries 0,52 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3 à 4,2, concentration en  $PO_4 \equiv 0,02$  M à 0,041 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en  $\mu$  l  $O_2$ /mg. h.



GRAPHIQUE 8. — Influence du pH sur l'inhibition par le sulfite. Graphique obtenu à partir des résultats du tableau XVI.

tration en sulfite, mais encore de la quantité de bactéries employées. A chaque essai correspond un chiffre, qui indique le  $Q\ O_2$  déterminé grâce à la méthode de Warburg à partir des observations faites dans les 20 premières minutes.

Le graphique 8 obtenu à partir des mêmes expériences indique pour quatre pH différents, que le pourcentage d'inhibition est proportionnel

à la concentration en sulfite, tant qu'on considère des inhibitions voisines de 50 p. 100. Afin de comparer entre eux les résultats obtenus à des pH différents, on a déterminé graphiquement la dose de sulfite nécessaire pour réaliser une inhibition de 50 p. 100. C'est l'objet du tableau XVII.

TABLEAU XVII

*Calcul de la dose d'acide sulfureux  
pour réaliser une inhibition de 50 p. 100 à divers pH.*

| pH  | SO <sub>2</sub> en $\mu$ mol/l.<br>donnant 50 % d'inhibition | Forme SO <sub>3</sub> H <sub>2</sub><br>en $\mu$ mol/l. | Forme SO <sub>3</sub> H <sup>-</sup><br>en $\mu$ mol/l. |
|-----|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 3   | 95                                                           | 5,2                                                     | 89,2                                                    |
| 3,4 | 195                                                          | 4,4                                                     | 190,5                                                   |
| 3,8 | 555                                                          | 5,06                                                    | 549                                                     |
| 4,2 | 780                                                          | 2,76                                                    | 774                                                     |

Valeurs calculées à partir du tableau XVI.

On a aussi calculé dans chaque cas les concentrations en molécules SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> et en ions SO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> auxquelles correspondent les doses de sulfite employées. On a utilisé pour ce calcul les formules approximatives

$$\log \frac{(\text{SO}_3\text{H}^-)}{(\text{SO}_3\text{H}_2)} = \text{pH} - \text{pK}_1$$

$$\log \frac{(\text{SO}_3^-)}{(\text{SO}_3\text{H}^-)} = \text{pH} - \text{pK}_2$$

en prenant  $\text{pK}_1 = 1,765$  et  $\text{pK}_2 = 7,205$  d'après les données de TARTAR et GARRETSON (82). On voit alors que, sauf pour l'expérience faite à pH 4,2 il semble que l'inhibition de 50 p. 100 soit obtenue lorsque le milieu contient 4,4 à 5,2  $\mu$  molécules par litre d'acide sulfureux sous sa forme moléculaire SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>. Comme ceci n'est vrai que dans un intervalle de pH assez étroit, il ne nous paraît pas possible d'affirmer que seules les molécules d'acide sulfureux ont des propriétés inhibitrices vis-à-vis d'*Acetobacter*. Les ions SO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, dont la toxicité ne paraît pas jouer de rôle entre 3 et 3,8, doivent contribuer à l'inhibition, lorsqu'on se trouve à un pH plus élevé.

#### REVERSIBILITE DE L'INHIBITION.

On distingue habituellement deux sortes d'inhibitions : celles qui sont absolues et celles qui sont réversibles. Les inhibitions absolues peuvent être dues à la formation d'une combinaison irréversible ou à une altération des protéines enzymatiques. Or on sait que le sulfite est capable de détruire des liaisons disulfures, et il peut donc endommager les protéines. Mais nous allons montrer que dans des conditions où l'acide sulfureux est incapable d'endommager les liaisons disulfures, par suite du pH trop bas

et de sa trop faible concentration, il se montre un inhibiteur réversible de la réaction enzymatique étudiée.

Plusieurs moyens ont permis de produire cette réversibilité. Le premier consiste à laver les bactéries déjà inhibées.

TABLEAU XVIII

*Réversibilité de l'inhibition, par lavage.*

|                              | SO <sub>2</sub> $\mu$ mol/ml. | QO <sub>2</sub> | Inhibition |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------|------------|
| Bactéries avant lavage ..... | 0                             | 536             |            |
|                              | 0,5                           | 448             | 16 %       |
|                              | 1                             | 0               | 100 %      |
|                              | 2                             | 0               | 100 %      |
| Bactéries après lavage ..... | 0                             | 468             |            |
|                              | 0,5                           | 416             | 11 %       |
|                              | 1                             | 416             | 11 %       |
|                              | 2                             | 400             | 15 %       |

Bactéries 0,5 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 0° dans du tampon McIlvaine. pH 3,8. Concentration en PO<sub>4</sub>  $\equiv$  0,032 M. Pour le lavage: 5 ml du mélange centrifugé 6 minutes à 3000 g. culot repris dans le même volume du même tampon. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère: air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>/mg. h.

Le tableau XVIII donne les résultats d'une expérience où des bactéries mises en présence de doses croissantes de sulfite ont présenté des inhibitions complètes. Il suffit de les centrifuger et de les remettre en suspension dans le même tampon pour retrouver une activité qui représente 85 à 89 p. 100 de celle du témoin.

TABLEAU XIX

*Réversibilité de l'inhibition, par dilution.*

|                                                        | SO <sub>2</sub> pendant la mesure en $\mu$ mol/ml. | QO <sub>2</sub> | Inhibition |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|------------|
| Bactéries $\oplus$ .....                               |                                                    | 644             |            |
| Bactéries + SO <sub>2</sub> $\oplus$ .....             | 2,3                                                | 0               | 100 %      |
| Bactéries diluées ( $\times$ ) .....                   |                                                    | 676             |            |
| Bactéries + SO <sub>2</sub> diluées ( $\times$ ) ..... | 0,76                                               | 273             | 60 %       |

Bactéries 10,3 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8. Concentration en PO<sub>4</sub>  $\equiv$  0,032 M. Sulfite 16  $\mu$  mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère: air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Bactéries diluées 7 fois ( $\oplus$ ) et 21 fois ( $\times$ ). Résultats exprimés en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>/mg.h.

La dilution des bactéries inhibées, diminue aussi l'inhibition. C'est ce que prouve l'expérience décrite par le tableau XIX.

Ces bactéries ont reçu une très forte dose de sulfite et on a mesuré leur respiration après les avoir diluées 7 et 21 fois. A la dilution la moins

forte, l'inhibition est encore complète alors qu'elle n'est plus que de 60 p. 100 dans l'autre cas.

On a déjà vu que l'inhibition par le sulfite varie beaucoup suivant le pH du milieu où elle se réalise. Les résultats relatés dans le tableau XX se rapportent à une inhibition qui a été réalisée à pH 3,8. Lorsqu'on mesure la respiration à des pH plus élevés l'inhibition qui était presque complète diminue jusqu'à un taux de 20 p. 100.

TABLEAU XX

*Réversibilité de l'inhibition, par changement du pH.*

|                                                     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| pH de la mesure.....                                | 3   | 3,8 | 4,8 | 5,8 | 6,8 |
| QO <sub>2</sub> { Incubé sans SO <sub>2</sub> ..... | 309 | 404 | 312 | 261 | 251 |
| QO <sub>2</sub> { Incubé avec SO <sub>2</sub> ..... | 0   | 34  | 238 | 208 | 182 |
| Inhibition % .....                                  | 100 | 91  | 39  | 20  | 27  |

Bactéries 10 mg/ml mises en incubation 30 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3,8 concentration en PO<sub>4</sub> = 0,032 M. Sulfite 13 µ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère: air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Bactéries diluées 20 fois avec du tampon McIlvaine au pH indiqué. Résultats exprimés en µ l. O<sub>2</sub>/mg.h.

Un autre moyen de supprimer l'inhibition consiste à mesurer la respiration des bactéries inhibées, en présence d'éthanal. Les résultats d'une telle expérience se trouvent dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI

*Réversibilité de l'inhibition, par addition d'éthanal.*

|                                                     |     |      |     |
|-----------------------------------------------------|-----|------|-----|
| Concentration en éthanal µ mol/ml. ....             | 177 | 35,4 | 7,1 |
| QO <sub>2</sub> { Incubé sans SO <sub>2</sub> ..... | 443 | 420  | 361 |
| QO <sub>2</sub> { Incubé avec SO <sub>2</sub> ..... | 392 | 221  | 161 |
| Inhibition en % .....                               | 12  | 47   | 56  |

Bactéries 0,21 mg/ml. mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8 concentration en PO<sub>4</sub> = 0,032 M. Sulfite 0,4 µ mol/ml. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère: air. Température 30° L'éthanal ajouté entraîne une dilution de 2 ml à 2,4 ml. Résultats exprimés en µ l. O<sub>2</sub>/mg. h.

On constate que l'inhibition passe de 56 à 12 p. 100 lorsque la concentration en éthanal s'élève de 7 à 177 µ mol/ml. Ce résultat s'explique par la grande affinité de l'éthanal pour le sulfite qui donne une combinaison éthane hydroxy sulfonate dépourvue de toxicité. ZELITCH (93) a signalé que ce corps est un inhibiteur de l'oxydase de l'acide glycolique. Aussi avons nous pensé qu'il était bon de vérifier qu'il n'inhibe pas la respiration de notre bactérie.

L'expérience, dont les résultats sont rapportés dans le tableau XXII, consiste à mesurer l'oxydation de l'éthanol en présence de quantités croissantes d'éthane-hydroxy-sulfonate de sodium préparé suivant la technique de BUNTE (11). La faible inhibition produite par la plus forte

dose s'explique par la dissociation de ce composé qui libère une petite quantité de sulfite. On peut donc conclure que l'affinité du sulfite pour les fonctions chimiques avec lesquelles il se combine dans les bactéries est moins grande que son affinité pour l'éthanal, puisque ce dernier restaure l'activité des bactéries inhibées. Les mesures que nous avons faites donnent comme constante de dissociation du sulfite en tant qu'inhibiteur des valeurs de  $7 \text{ à } 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , alors que la combinaison chimique éthanal sulfite possède d'après KERP (49) une constante de dissociation égale à  $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , ce qui indique que le complexe formé avec les bactéries est moins stable que celui formé avec l'éthanal.

TABLEAU XXII

*Influence de la combinaison bisulfite de l'éthanal  
sur l'oxydation de l'éthanol.*

| Aldéhyde sulfite $\mu$ mol/ml. | QO <sub>2</sub> | Inhibition %. |
|--------------------------------|-----------------|---------------|
| 0                              | 465             | —             |
| 0,74                           | 495             | 0             |
| 1,59                           | 466             | 0             |
| 2,97                           | 474             | 0             |
| 5,95                           | 415             | 12            |

Bactéries 0,31 mg/ml. mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8. concentration en PO<sub>4</sub> = 0,032 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>/mg. h.

TABLEAU XXIII

*Influence de la tension d'oxygène sur l'inhibition.*

| SO <sub>2</sub> $\mu$ mol/ml. | Respiration dans l'air |              | Respiration dans l'oxygène |              |
|-------------------------------|------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
|                               | QO <sub>2</sub>        | Inhibition % | QO <sub>2</sub>            | Inhibition % |
| 0 .....                       | 640                    |              | 710                        |              |
| 0,2 .....                     | 504                    | 21 %         | 564                        | 20 %         |
| 0,4 .....                     | 408                    | 36 %         | 472                        | 33 %         |
| 0,6 .....                     | 220                    | 65 %         | 210                        | 70 %         |

Bactéries 0,5 mg/ml. mises en incubation 20 minutes à 30° dans du tampon Mc Ilvaine. pH 3,8. Concentration en PO<sub>4</sub> = 0,032 M. Respiration mesurée selon la technique de Warburg. Atmosphère : air ou oxygène. Température 30°. Ethanol 0,05 M. Résultats exprimés en  $\mu$  l. O<sub>2</sub>/mg.h.

Enfin, nous avons cherché à savoir si l'inhibition ne peut pas être diminuée lorsqu'on augmente la tension d'oxygène.

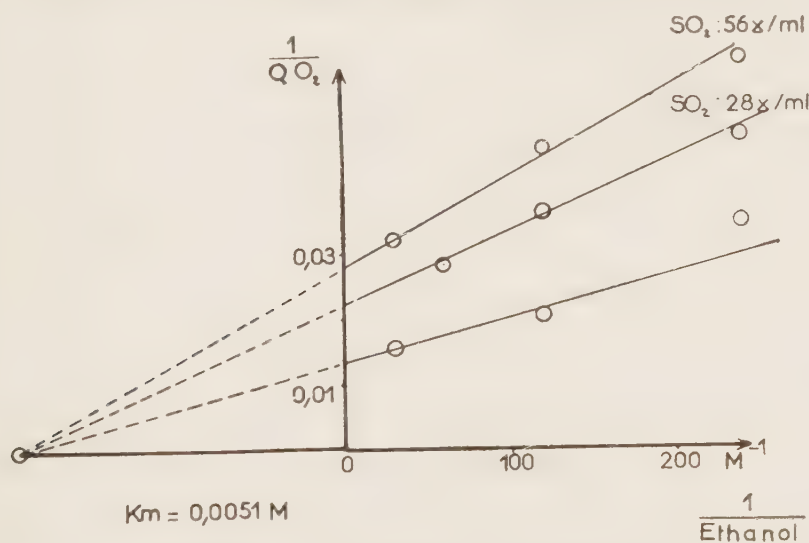
Le tableau XXIII donne les résultats d'une expérience où la respiration de bactéries inhibées par diverses doses de sulfite a été mesurée dans l'air et dans l'oxygène. Dans le cas des bactéries non inhibées, on

remarque que la respiration augmente légèrement lorsqu'on passe de l'air à l'oxygène. Les expériences antérieures, particulièrement celles de WIELAND et BERTHO (89), avaient indiqué la même valeur pour des expériences faites dans l'air et dans l'oxygène. Au contraire, le taux d'inhibition est tout à fait comparable dans les deux séries de mesures. Il semble donc que la tension d'oxygène n'intervienne pas dans le mécanisme de l'inhibition.

Quatre expériences différentes nous démontrent donc que le sulfite produit, dans les conditions où nous l'avons utilisé, une inhibition réversible, et que la réversibilité est excellente puisqu'elle peut atteindre 80 à 90 p. 100. On est donc amené pour expliquer ces résultats, à envisager l'existence d'une réaction facilement réversible entre le sulfite et certaines fonctions chimiques du système enzymatique d'*A. rancens*.

#### NATURE DE L'INHIBITION.

Les données cinétiques sur l'oxydation de l'éthanol par les *Acetobacter* montrent que la réaction satisfait à l'isotherme d'absorption de



GRAPHIQUE 9. — Relation entre l'activité respiratoire et la concentration en sulfite et en éthanol.

LANGMUIR (53), dont la théorie de MICHAELIS-MENTEN n'est qu'un cas particulier. On a cherché à savoir comment se comporte le sulfite vis-à-vis de cette réaction.

Le graphique 9 représente la variation de l'inverse de la vitesse d'oxydation en fonction de l'inverse de la concentration en substrat, système de coordonnées introduit par LINEWEAVER et BURK (54). L'expérience a été faite avec des bactéries broyées, et répétée avec deux concentrations différentes d'inhibiteur.

On voit immédiatement que la constante apparente de dissociation du complexe substrat bactérie n'est pas modifiée, lorsqu'on ajoute du sulfite. C'est là, la propriété d'un inhibiteur non compétitif. Le sulfite se combine donc sur un centre de la bactérie différent de celui sur lequel se fixe l'éthanol. La constante de dissociation pour l'inhibiteur a été trouvée égale à 7 et 8  $10^{-4}$  M dans ces deux expériences réalisées avec un extrait, à pH 3,8.

#### DISCUSSION DES RESULTATS.

L'action bactéricide de l'acide sulfureux était connue depuis longtemps. Il restait cependant à préciser s'il agissait comme destructeur de certains systèmes enzymatiques ou bien comme un inhibiteur réversible. Les expériences que nous avons rapportées démontrent que l'acide sulfureux doit être considéré comme un inhibiteur. Il est en effet actif à une très faible concentration ; dans les expériences réalisées à pH 3,8 les inhibitions de 50 p. 100 sont obtenues le plus souvent avec des concentrations voisines de 5  $10^{-4}$  M. L'inhibition n'est pas due à une action destructrice, puisqu'il a été possible de restaurer jusqu'à 90 p. 100 de l'activité des bactéries entièrement inhibées.

Il est certain que le blocage de la fermentation acétique au stade éthanal par formation d'une combinaison bisulfite, telle qu'elle a été réalisée par Neuberg, ne peut pas expliquer l'inhibition de l'oxydation de l'éthanol. Cette réaction enzymatique se fait au moins en deux stades :



A et A' sont vraisemblablement du diphosphopyridine nucléotide puisqu'on a pu extraire d'*Acetobacter* des deshydrogénases de l'éthanol et de l'éthanal qui requièrent cette coenzyme (50) (51). Nous avons aussi contrôlé, que les extraits obtenus avec notre souche sont capables de réduire cette coenzyme en présence d'éthanol ou d'éthanal, et qu'en présence d'air, ils oxydent la coenzyme réduite et l'éthanol avec des vitesses voisines. Si l'action enzymatique était bloquée par suite de la formation d'une combinaison bisulfite de l'éthanal, seule la réaction (2) pourrait être inhibée et la consommation d'oxygène mesurée ne serait en aucun cas inférieure à la moitié de ce qu'elle est dans la réaction normale. Ensuite il faudrait s'attendre à ce que la réaction reprenne sa vitesse normale lorsque tout le sulfite est combiné. Or ce n'est pas ce qu'on observe. Au contraire la vitesse se stabilise après quelques minutes d'incubation à une valeur plus basse que celle du témoin sans sulfite, et il est aussi possible de produire des taux d'inhibition supérieurs à 50 p. 100.

Les recherches d'éthanal et de sa combinaison bisulfite, que nous avons faites dans plusieurs expériences, montrent que ces composés se forment en faible quantité. L'expérience décrite dans le tableau XI indique

que, dans ce cas particulier, il s'est produit de l'éthanal en quantité suffisante pour combiner les deux tiers du sulfite. Il apparaît donc que l'accumulation de petites quantités d'éthanal en présence de sulfite est une chose certaine, mais, à pH 3,8, cette voie déviée du métabolisme ne représente qu'une valeur infime par rapport à l'acétate formé : exactement 1/250<sup>e</sup> dans cette expérience.

Des expériences ont montré que la combinaison bisulfitique de l'éthanal ne possède aucun pouvoir inhibiteur. Au contraire l'addition d'éthanal à des bactéries déjà inhibées fait cesser l'inhibition.

Enfin, d'après les connaissances déjà acquises concernant l'action du sulfite sur les protéines, on aurait pu penser que l'inhibition était due à une réaction de Clarke produisant la rupture des liaisons disulfures dans les protéines. Les essais d'inhibitions réalisés avec les bactéries, les débris et l'extrait montrent au contraire que le sulfite doit réagir principalement sur le système enzymatique. En effet, la présence de protéines non enzymatiques ou de protéines enzymatiques dénaturées par chauffage, ne modifie que très peu la concentration en sulfite qu'il faut atteindre pour obtenir une inhibition donnée.

En résumé, l'acide sulfureux apparaît dans nos expériences comme un inhibiteur réversible et non compétitif de l'oxydation de divers substrats et en particulier de l'éthanol. Son efficacité paraît surtout être due aux molécules non dissociées, mais il est vraisemblable que les ions  $\text{SO}_3\text{H}^-$  doivent y contribuer, principalement dans la zone de pH favorable à leur existence.

---

## CHAPITRE IV

### FIXATION DE L'ACIDE SULFUREUX SUR LES BACTÉRIES

Les résultats exposés dans la première partie de ce travail permettent de supposer, qu'une fraction au moins de l'acide sulfureux que l'on ne retrouve plus dans le liquide après un certain temps d'incubation, peut s'être fixée sur les corps bactériens. Il faut aussi envisager une autre cause de disparition de l'acide sulfureux : son oxydation en sulfate, qui peut être due à des enzymes ou à de simples catalyseurs chimiques. Pour départager l'importance de ces deux phénomènes, il aurait été nécessaire de faire un bilan du soufre, or le dosage des faibles quantités de sulfate en présence de sulfite et de concentrations importantes en phosphate, a présenté des difficultés insurmontables. La microméthode de DOGSON et SPENCER (22) qui consiste à former un précipité de sulfate de benzidine, que l'on détermine par colorimétrie en présence de thymol et d'acide nitreux, bien que très sensible, n'a pas donné de bons résultats.

Il faut donc s'adresser à une technique permettant de doser directement la quantité d'acide sulfureux fixé sur les corps bactériens. L'emploi d'acide sulfureux radioactif a permis de déceler avec facilité de très faibles quantités et s'est montré bien approprié à ce genre d'étude. On peut alors mesurer directement la radioactivité et non plus calculer l'incorporation du sulfite par différence. On augmente ainsi considérablement la précision des résultats.

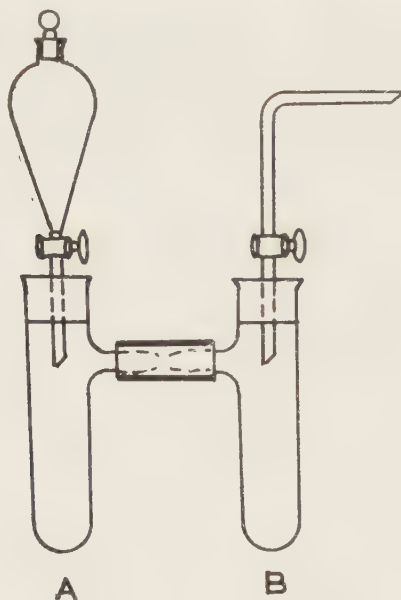
#### I. — Techniques.

##### a) Purification du sulfite radioactif.

On a utilisé comme marqueur une solution de sulfite de sodium  $^{35}\text{S}$  livrée par le Commissariat à l'Energie Atomique. La solution avait déjà commencé à s'oxyder et contenait une partie de sa radioactivité sous forme de sulfate. Aussi avons-nous préféré la purifier avant l'emploi.

Le montage représenté sur le graphique 10 a été utilisé. La solution radioactive, soit 10 ml contenant 4 m. mol. de sulfite, est introduite dans le tube A et on place dans le tube B, 4 ml de soude 2 N qui suffisent à fixer sous forme de sulfite neutre, tout l'anhydride sulfureux dégagé. Le contenu du tube A est congelé avec un mélange glace carbonique-alcool, on fait alors le vide dans l'appareil, on laisse réchauffer lentement et

lorsque le produit est redevenu liquide on introduit au moyen d'une ampoule à brome 4 à 5 ml d'acide sulfurique 6 N. Après 16 heures, on recueille dans le tube B une solution de sulfite qui a été soumise à l'analyse. Le titre mesuré par iodométrie était de 0,172 M et la radioactivité de 1,3 m curie/ml, soit une radioactivité spécifique de 7,5 mc/m mol.



GRAPHIQUE 10. — Appareil utilisé pour la purification du sulfite radioactif.

#### b) Mesure de la radioactivité.

Le  $^{35}\text{S}$  émet un seul rayonnement d'électrons négatifs de faible énergie : 0,167 MeV. Sa détection a été faite avec un compteur de Geiger-Muller GEC à fenêtre de mica, de  $1,9 \text{ mg/cm}^2$ , couplé à une échelle de comptage E C G 3 de la Société d'Applications Industrielles de la Physique. Le voltage de travail a été réglé à 1450 V. Dans ces conditions, on a vérifié avec un étalon que 1 microcurie correspond à 2420 coups/seconde.

Les échantillons constitués par des liquides ou des suspensions bactériennes sont étalés sur des plaques d'aluminium dégraissées. Pour éviter les pertes de sulfite par volatilisation, qui peuvent se produire lorsqu'on travaille avec des solutions acides de sulfite, on introduit la prise d'essai dans une goutte de soude 0,1 N. La préparation est étalée dans un cercle de 2 cm de diamètre et séchée à l'air chaud. Pour chaque mesure, on prépare au moins 2 plaques identiques. La correction d'absorption propre est inutile, puisque les échantillons comptés, même ceux qui contiennent des bactéries, ont toujours moins de 0,5 mg de matière sèche ; dans ces

conditions, la correction est inférieure à 1 p. 100, elle est donc négligeable devant les autres causes d'erreur.

## II. — Fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries.

L'expérience qui met en évidence cette fixation, consiste à mettre en incubation les bactéries en présence de sulfite radioactif et à déterminer la radioactivité qui se trouve liée aux corps bactériens. Le mode opératoire utilisé est le suivant. Dans des tubes à centrifuger coniques de 10 ml, on ajoute dans l'ordre indiqué : 1 ml de suspension qui contient environ 5 mg de bactéries (poids sec), 1 ml de tampon Mc Ilvaine au pH désiré et 0,1 ml d'une solution de sulfite de sodium 0,02 M contenant comme marqueur 5 p. 1000 en volume de la solution de sulfite radioactif qui a été obtenue après purification. Les tubes sont bouchés au caoutchouc et maintenus à 0° pendant la période d'incubation. On centrifuge ensuite 5 minutes à 3500 g. La radioactivité du liquide surnageant est déterminée sur une partie aliquote, habituellement 20  $\mu$  l. Il est indispensable, lorsqu'on travaille en milieu acide avec l'acide sulfureux radioactif, de boucher les tubes aussitôt que le produit est introduit pour éviter les risques de contamination radioactive.

Les bactéries formant un culot compact au fond du tube, il est possible de verser le liquide et de nettoyer les parois, afin d'éliminer le maximum de liquide radioactif. La méthode adoptée est inspirée de celle utilisée par DOGSON et SPENCER (22) pour le nettoyage des tubes contenant de très petits précipités de sulfate de benzidine. On commence à essuyer l'intérieur du tube avec un tampon de papier filtre, serré dans une pince. Ensuite, avec une pipette recourbée, on rince les parois intérieures du tube maintenu vertical, puis on essuie à nouveau. Le culot peut alors être repris dans une quantité connue de soude 0,05 N, en général 250  $\mu$  l. Les bactéries forment une suspension visqueuse, dont on prélève une partie aliquote, en général 20  $\mu$  l., pour déterminer la radioactivité fixée.

Il est indispensable de corriger cette mesure, car le culot bactérien contient encore une quantité non négligeable de liquide radioactif, qui se dilue lorsqu'on le reprend dans la soude. D'autre part, il change le volume final dans lequel se trouvent les bactéries. Il est possible de déterminer la quantité d'eau ainsi retenue en faisant la différence de pesée du tube, culot humide et après séchage à 105°. Cette mesure a été faite sur 4 essais différents et a donné des chiffres assez voisins, à savoir : 30,5 ; 29,2 ; 28,1 ; 27,5 mg d'eau. Dans toutes nos expériences, cette double correction a été faite en estimant à 30 mg le poids d'eau contenue dans les bactéries. Lorsqu'elles sont reprises dans 250  $\mu$  l et que les déterminations sont faites sur 20  $\mu$  l, la radioactivité totale est calculée de la façon suivante :

Soit  $a$ , la radioactivité dans 20  $\mu$ l de liquide surnageant et  $b$ , la radioactivité dans 20  $\mu$ l des bactéries remises en suspension, la radioactivité totale fixée est :

$$\frac{b \times (250 + 30)}{20} - \frac{a \times 30}{20}.$$

Cette correction est approchée par excès, puisqu'elle ne tient pas compte d'une partie de l'eau qui est intracellulaire. En toute rigueur il ne faudrait retrancher que la radioactivité du liquide qui entoure les corps microbiens. Nous pensons cependant que la précision de la méthode n'aurait pas été améliorée par cette correction plus parfaite.

TABLEAU XXIV

*Fixation du sulfite radioactif  
sur les bactéries à deux pH différents.*

| Durée de l'incubation | Radioactivités en c/s |                    |                                                |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------------------------|
|                       | dans le surnageant    | dans les bactéries | % de SO <sub>2</sub> fixé<br>par les bactéries |
| A pH 6,8              |                       |                    |                                                |
| 5 mn .....            | 1680                  | 4,75               | 0,28                                           |
| 45 mn .....           | 1680                  | 5                  | 0,30                                           |
| 180 mn .....          | 1680                  | 0                  | 0                                              |
| A pH 3,8              |                       |                    |                                                |
| 5 mn .....            | 1590                  | 64                 | 3,85                                           |
| 45 mn .....           | 1590                  | 64,7               | 2,90                                           |
| 180 mn .....          | 1590                  | 41,7               | 2,56                                           |

Bactéries 1,56 mg/ml mises en incubation à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3,8, concentration en PO<sub>4</sub> = 0,036 M ou pH 6,8 concentration en PO<sub>4</sub> = 0,0081 M. Sulfite 0,48  $\mu$ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

Le tableau XXIV donne la description et les résultats d'une telle expérience réalisée à deux pH différents. La radioactivité incorporée dans les bactéries du culot a été suivie en fonction de la durée d'incubation. Les résultats indiquent la radioactivité du liquide surnageant exprimée en coups/s et la radioactivité fixée sur les bactéries exprimée dans les mêmes unités. Le rapport de ces deux valeurs permet de déterminer le pourcentage de sulfite qui s'est fixé sur les bactéries.

Ces premiers résultats démontrent que la technique choisie convient pour mettre en évidence et étudier la fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries. Il apparaît alors que la fixation très faible en milieu neutre devient environ 15 fois plus forte lorsque le pH s'abaisse à 3,8. Le temps d'incubation influe sur la quantité d'acide sulfureux fixé, de même qu'il influe sur le degré d'inhibition, ainsi qu'on l'a déjà démontré (p. 48). Une expérience analogue a été refaite en choisissant 20° comme température d'incubation ; elle est décrite dans le tableau XXV.

Dans les deux expériences, on remarque que le maximum de sulfite fixé est rapidement obtenu, que l'on opère à 0° ou à 20°. Mais à 20° il diminue plus rapidement qu'à 0°. C'est cette raison qui nous a déterminé à choisir la température de 0° pour faire nos essais et à faire une incubation comprise entre 5 et 45 minutes (en général 30 minutes), puisque dans ces conditions la quantité d'acide sulfureux combiné reste à peu près constante. On remarque dans ces essais une particularité que nous n'avons pu expliquer : c'est la disparition du sulfite fixé sur les bactéries lorsqu'on prolonge l'incubation.

TABLEAU XXV

*Fixation du sulfite radioactif  
sur les bactéries en fonction du temps.*

| Durée de l'incubation | SO <sub>2</sub> en c/s |                    | % SO <sub>2</sub><br>fixé sur les bactéries |
|-----------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
|                       | dans le surnageant     | dans les bactéries |                                             |
| 5 mn.                 | 5280                   | 435                | 7,6                                         |
| 30 mn.                | 5250                   | 371                | 6,6                                         |
| 140 mn.               | 5200                   | 138                | 2,6                                         |
| 260 mn.               | 5130                   | 63,7               | 1,2                                         |

Bactéries 3,3 mg/ml. mises en incubation à 20° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3,8, concentration en PO<sub>4</sub> ≡ 0,036 M. Sulfite 0,48 μ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour de volume.

**a) Cas des bactéries traitées à l'iode ou inactivées par chauffage.**

Afin de voir si la fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries présente une signification biologique, nous avons recherché s'il existe sur ce point des différences entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes ou modifiées par certains traitements.

Les réactifs les plus intéressants nous ont paru ceux susceptibles de modifier les groupements sulphydryles, dont l'importance est en général primordiale pour l'activité enzymatique. On peut penser que l'iode, susceptible d'oxyder les groupements sulphydryles en disulfures en milieu neutre, doit aussi modifier la fixation de l'acide sulfureux. Cette technique a déjà été utilisée par de nombreux auteurs pour l'étude des protéines enzymatiques (3) (27). Au cours d'essais préliminaires, on a remarqué que l'iode était absorbée en grande quantité sur les corps bactériens. Il était donc nécessaire de l'éliminer, dans la mesure du possible, afin que l'acide sulfureux ne puisse pas réagir sur l'iode ainsi absorbée, ce qui empêcherait de déceler celui qui serait susceptible de réagir avec les groupes sulphydryles libres. Le lavage à l'eau ne s'étant pas montré efficace, l'iode absorbée a dû être éliminée par lavage des bactéries avec de l'hyposulfite 0,001 N. Sur ce principe on a effectué l'expérience décrite dans le tableau XXVI.

La fixation d'acide sulfureux radioactif a été comparée sur des bactéries traitées et non traitées à l'iode, à pH 6,8 et pH 3. Les résultats montrent que les bactéries traitées à l'iode fixent l'acide sulfureux dans des

TABLEAU XXVI

*Influence d'un traitement à l'iode  
sur la fixation du sulfite radioactif.*

|                                     | Radioactivité en c/s |                    | % de SO <sub>2</sub> fixé<br>sur les bactéries |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------------------------------|
|                                     | dans le surnageant   | dans les bactéries |                                                |
| à pH 3:                             |                      |                    |                                                |
| Bactéries témoin ⊕ .....            | 1242                 | 108,7              | 8,05                                           |
| Bactéries traitées à l'iode + ..... | 1265                 | 37,8               | 2,90                                           |
| à pH 6,8:                           |                      |                    |                                                |
| Bactéries témoins ⊕ .....           | 1282                 | 3,28               | 0,26                                           |
| Bactéries traitées à l'iode + ..... | 1248                 | 25,9               | 2,04                                           |

Bactéries 4 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3 concentration en phosphate 0,02 M. Sulfite 0,48  $\mu$  mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

+ Bactéries traitées dans les conditions suivantes. Bactéries 4,7 mg/ml mises en incubation 15 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 6,8, concentration en PO<sub>4</sub> = 0,081 M. Iode 0,028 N. Centrifugé, Lavé dans la quantité nécessaire d'hyposulfite 0,001 N. jusqu'à décoloration des bactéries. Repris dans l'eau.

⊕ Même traitement sauf l'addition d'iode.

TABLEAU XXVII

*Fixation du sulfite radioactif  
par les bactéries inactivées par la chaleur.*

| pH  | Bactéries actives    |                    |                           | Bactéries chauffées 5 mn à 100° |                    |                           |
|-----|----------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------|
|     | Radioactivité en c/s |                    |                           | Radioactivité en c/s            |                    |                           |
|     | dans le surnageant   | dans les bactéries | % de SO <sub>2</sub> fixé | dans le surnageant              | dans les bactéries | % de SO <sub>2</sub> fixé |
| 3   | 1054                 | 130                | 12,3                      | 1064                            | 20,6               | 1,94                      |
| 4,8 | 1162                 | 51,2               | 4,4                       | 1196                            | 0                  | 0,0                       |
| 6,8 | 1162                 | 10,9               | 0,94                      | 1212                            | 1,2                | 0,1                       |

Bactéries 6 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine pH 3, concentration en PO<sub>4</sub> = 0,02 M, pH 4,8 concentration en PO<sub>4</sub> = 0,05 M. pH 6,8, concentration en PO<sub>4</sub> = 0,08 M. Sulfite 0,5  $\mu$  mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

proportions et des conditions bien différentes des bactéries témoins. En particulier, lorsqu'on passe de pH 6,8 à pH 3, la quantité d'acide sulfureux fixée augmente de 33 fois pour les bactéries témoins, alors qu'elle augmente de 1,4 fois pour les bactéries ayant subi le traitement à l'iode. Le fait que ces dernières présentent une absorption importante d'acide sulfureux,

même en milieu neutre, n'a rien de surprenant, car on peut admettre que le traitement ménagé à l'hyposulfite n'a pas suffi à faire entièrement disparaître l'excès d'iode de l'intérieur ou de la surface des corps bactériens. Un résultat assez analogue est obtenu lorsque les bactéries sont inactivées par chauffage.

L'expérience est décrite dans le tableau XXVII qui compare la fixation de l'acide sulfureux sur des bactéries fraîches et des bactéries bouillies et cela à trois pH différents. Ici aussi les bactéries mortes fixent beaucoup moins d'acide sulfureux que les bactéries actives.

b) **Variation de l'acide sulfureux fixé en fonction du pH.**

Les expériences que nous avons déjà rapportées montrent que la fixation du sulfite varie beaucoup avec le pH. En vue de rechercher la relation qui peut exister entre ces deux variables, nous avons mesuré la fixation dans un même système tampon, à des pH allant de 2,6 à 6,8. Le pH 2,6 peut paraître extrêmement bas mais nous avons montré qu'il n'est pas dépourvu de signification biologique (voir p. 41).

TABLEAU XXVIII  
*Fixation du sulfite radioactif en fonction du pH.*

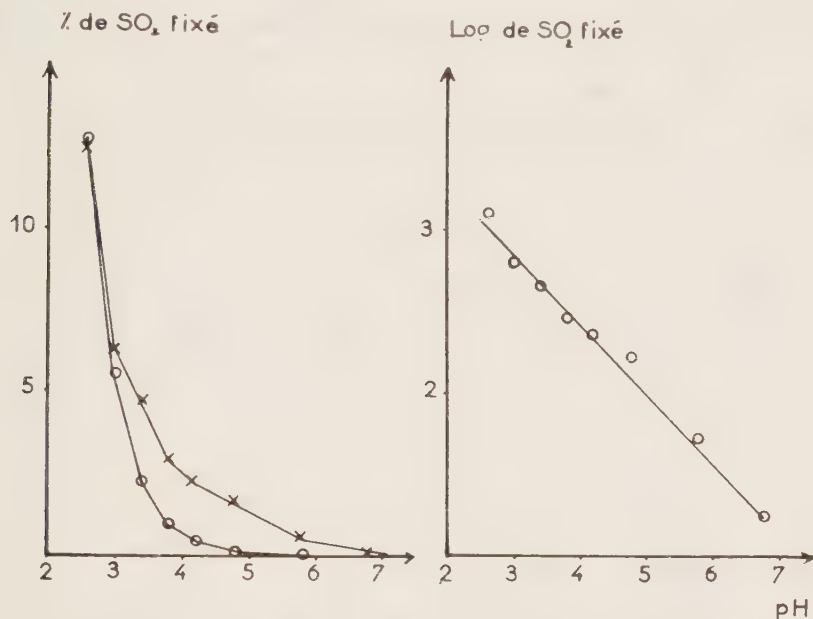
| pH  | Radioactivité c/s  |                    |       | % de SO <sub>2</sub> fixé | % de SO <sub>2</sub> sous la forme SO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> |
|-----|--------------------|--------------------|-------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|     | dans le surnageant | dans les bactéries | total |                           |                                                                   |
| 6,8 | 1913               | 3,36               | 1916  | 0,175                     | 0,00066                                                           |
| 5,8 | 1995               | 10,55              | 2005  | 0,52                      | 0,0088                                                            |
| 4,8 | 1840               | 30,3               | 1870  | 1,62                      | 0,091                                                             |
| 4,2 | 1800               | 42,4               | 1840  | 2,30                      | 0,36                                                              |
| 3,8 | 1810               | 54                 | 1864  | 2,90                      | 0,91                                                              |
| 3,4 | 1638               | 79,5               | 1718  | 4,63                      | 2,26                                                              |
| 3   | 1617               | 109                | 1726  | 6,33                      | 5,49                                                              |
| 2,6 | 1428               | 206                | 1634  | 12,6                      | 12,75                                                             |

Bactéries 2,8 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 6° dans du tampon Mc Ilvaine. Sulfite 0,5  $\mu$  mol/ml Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume. Pour le calcul de la forme SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> voir page 55.

Les résultats rapportés dans le tableau XXVIII indiquent comment se comporte une même quantité de bactéries mise en présence de la même concentration de sulfite à des pH différents. On constate facilement que le pourcentage de sulfite fixé augmente d'une façon continue lorsque le pH diminue.

Le graphique II a été fait en vue d'explicitier la relation qui existe entre ces deux variables. Si l'on représente le logarithme de la quantité de sulfite fixé en fonction du pH, les points sont assez bien alignés pour qu'on puisse admettre qu'il existe une relation linéaire entre les deux valeurs. Il nous a paru intéressant de savoir si la fixation de l'acide sul-

fureux est le fait des molécules non dissociées ou des ions. C'est dans cette intention qu'a été construit le graphique qui compare pour chaque pH, le pourcentage de sulfite fixé, au pourcentage de la forme moléculaire. Aux pH 3-2,6 tout se passe comme si tout l'acide sulfureux non ionisé se fixait sur les bactéries. Entre pH 7 et pH 3, le pourcentage d'acide sulfureux fixé est supérieur à celui qui peut être présent sous forme non ionisée, il faut donc admettre que des ions  $\text{SO}_3\text{H}^-$  se fixent aussi. Au-dessus de pH 7 la fixation est à peu près nulle, ce qui indique que les ions  $\text{SO}_3^-$  ne peuvent se fixer sur les bactéries.



GRAPHIQUE II. — Représentation graphique des données du tableau XXVII.

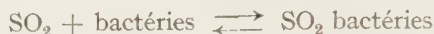
(X) % de  $\text{SO}_2$  sous la forme  $\text{SO}_3\text{H}_2$ .

(O) % de  $\text{SO}_2$  fixé sur les bactéries.

### c) Variation de l'acide sulfureux. fixé en fonction de la concentration.

La combinaison de l'acide sulfureux avec les bactéries est une réaction réversible et limitée, comme la formation des autres combinaisons bisulfitiques. La réversibilité apparaît dans l'expérience, où l'on a lavé les bactéries traitées par l'acide sulfureux. L'existence d'un équilibre se déduit du fait que la combinaison n'est jamais complète. Afin de chercher à préciser quantitativement cet état d'équilibre, on a déterminé l'acide sulfureux fixé sur la même quantité de bactéries en fonction de sa concentration. L'expérience a été répétée à deux pH différents. Les résultats sont contenus dans le tableau XXIX.

On a cherché à interpréter ces résultats en admettant qu'il existe sur les bactéries une seule fonction chimique susceptible de se combiner à l'acide sulfureux. La réaction peut être schématisée par la formule suivante



et l'équilibre est atteint lorsque

$$\frac{(\text{SO}_2) [(\text{bactéries}) - (\text{SO}_2 \text{ bactéries})]}{(\text{SO}_2 \text{ bactéries})} = K$$

où  $(\text{SO}_2)$  et  $(\text{SO}_2 \text{ bactéries})$  sont connus par les mesures de radioactivité. La seule inconnue pour pouvoir calculer  $K$  est la concentration en l'hypothétique fonction chimique présente sur les bactéries. Lorsqu'on réalise plusieurs expériences qui contiennent au départ la même quantité de bactéries, il est possible d'éliminer la valeur (bactéries) entre deux équations

TABLEAU XXIX

*Fixation du sulfite radioactif en fonction de sa concentration.*

|        | SO <sub>2</sub> en μ mol/l | Radioactivité en c/s |                    |                           |                                 |
|--------|----------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------------|
|        |                            | dans le surnageant   | dans les bactéries | % de SO <sub>2</sub> fixé | μ mol/l de SO <sub>2</sub> fixé |
| pH 3   | 7600                       | 1216                 | 94,6               | 7,20                      | 547                             |
|        | 3800                       | 1250                 | 54,0               | 4,14                      | 157                             |
|        | 1900                       | 1292                 | 45,6               | 3,40                      | 65                              |
|        | 950                        | 1330                 | 28,8               | 2,10                      | 20                              |
| pH 3,8 | 7600                       | 1415                 | 49,8               | 3,40                      | 258                             |
|        | 3800                       | 1415                 | 42,0               | 2,88                      | 109                             |
|        | 1900                       | 1416                 | 17,3               | 1,20                      | 22,8                            |
|        | 950                        | 1430                 | 9,4                | 0,65                      | 6,2                             |

Bactéries 2 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3, concentration en  $\text{PO}_4 \equiv 0,02$  M et pH 3,8, concentration en  $\text{PO}_4 \equiv 0,034$  M. Chaque expérience est réalisée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

tions et de déterminer  $K$ . On a effectué ce calcul avec les données du tableau XXIX et il a conduit à des valeurs négatives de  $K$ , ce qui est absurde et indique que notre hypothèse de départ n'est pas vérifiée.

Il est plus vraisemblable que l'acide sulfureux puisse réagir sur plusieurs fonctions chimiques A, B... N présentes sur les bactéries. On obtient alors la série d'équilibre suivant

$$\frac{(\text{SO}_2)[(\text{A}) - (\text{SO}_2\text{A})]}{(\text{SO}_2\text{A})} = K_A$$

$$\frac{(\text{SO}_2)[(\text{B}) - (\text{SO}_2\text{B})]}{(\text{SO}_2\text{B})} = K_B$$

et la relation  $(\text{SO}_2\text{A}) + (\text{SO}_2\text{B}) + \dots (\text{SO}_2\text{N}) = \text{SO}_2$  combiné aux bactéries. En combinant ces trois équations on obtient :

$$(\text{SO}_2 \text{ bactéries}) = (\text{SO}_2) \frac{(\text{A})}{K_A + (\text{SO}_2)} + \frac{(\text{B})}{K_B + (\text{SO}_2)} + \dots \frac{(\text{N})}{K_N + (\text{SO}_2)}$$

qu'il est impossible de résoudre tant qu'on ne connaît pas  $K_A$ ,  $K_B$ ,...  $K_N$ . On est en présence d'un équilibre trop complexe pour être défini par une seule constante. Une difficulté analogue a été rencontrée par INGRAM et VAS (43), lorsqu'ils ont essayé de trouver la relation qui existe entre l'acide sulfureux libre et l'acide sulfureux combiné dans les jus d'oranges. Nous sommes donc amenés à admettre, comme ces auteurs, que plusieurs composés chimiques participent à la fixation de l'acide sulfureux.

#### d) Recherche de la fixation du sulfate.

Pour notre étude de l'inhibition par l'acide sulfureux, il était important de rechercher si son accumulation dans les bactéries était un phénomène spécifique ou s'il se retrouvait lorsque les bactéries étaient mises en présence d'autres acides. Deux expériences parallèles, en milieu neutre et acide, ont été conduites l'une avec du sulfite, l'autre avec du sulfate radioactifs. Le sulfate radioactif provenait aussi d'une livraison du Commissariat à l'Énergie Atomique.

TABLEAU XXX

*Fixation comparée du sulfate et du sulfite radioactifs.*

| Produit radioactif utilisé | Expérience à pH 6,8  |                    |        | Expérience à pH 3,8  |                    |        |
|----------------------------|----------------------|--------------------|--------|----------------------|--------------------|--------|
|                            | Radioactivité en c/s |                    |        | Radioactivité en c/s |                    |        |
|                            | dans le surnageant   | dans les bactéries | % fixé | dans le surnageant   | dans les bactéries | % fixé |
| Sulfite .....              | 3673                 | 0                  | 0      | 3697                 | 88                 | 2,3    |
| Sulfate .....              | 533                  | 2,3                | 0,43   | 554                  | 2,45               | 0,44   |

Bactéries 1,8 mg/ml mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3,8, concentration en  $\text{PO}_4^{=}$  0,036 M. Sulfite ou sulfate 0,5  $\mu$  mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

Les résultats du tableau XXX montrent que la quantité de sulfate radioactif retrouvée sur les corps bactériens est très faible et tout à fait indépendante du pH. On voit donc que l'acide sulfureux se comporte d'une façon différente de l'acide sulfurique. Son accumulation n'est pas uniquement explicable par une différence de perméabilité des membranes microbiennes en milieu neutre et en milieu acide. L'existence d'une liaison de l'acide sulfureux par absorption sur les colloïdes ne permet pas

non plus d'expliquer pourquoi l'acide sulfureux se fixe et non pas l'acide sulfurique. Par contre, les résultats s'expliquent si l'on admet une combinaison chimique véritable entre l'acide sulfureux et certaines fonctions chimiques présentes dans les cellules.

### III. — Réversibilité de la fixation de l'acide sulfureux.

Des expériences déjà décrites ont montré que l'inhibition par l'acide sulfureux pouvait être levée presque totalement par un simple lavage des bactéries (voir page 55). Il était intéressant de rechercher si l'acide fixé pouvait être éliminé au moins partiellement par le même procédé.

TABLEAU XXXI  
*Elimination par lavage du SO<sub>2</sub> fixé.*

| Radioactivité en c/s.                              | Expérience n° 1 | Expérience n° 2 |
|----------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| dans le surnageant .....                           | 1376            | 1376            |
| dans les bactéries .....                           | 137,5           | 145,2           |
| dans les bactéries après lavage <sup>(1)</sup> ... | 19,6            | 22,7            |

Bactéries 2,7 mg/ml. mises en incubation 10 minutes à 0° dans du tampon Mc Ilvaine, pH 3, concentration en PO<sub>4</sub> ≡ 0,02 M. Sulfite 0,5 μ mol/ml. Chaque expérience est effectuée sur une prise d'essai de 2 ml et les résultats exprimés pour ce volume.

<sup>(1)</sup> Lavage par remise en suspension des bactéries dans 2 ml. du même tampon.

Le tableau XXXI précise les conditions dans lesquelles l'expérience a été faite. Les résultats indiquent que 85 p. 100 de l'acide sulfureux fixé ont disparu après un simple lavage, dans une quantité minime de tampon. Il est intéressant de rapprocher ce résultat de celui obtenu lorsqu'on a étudié la réversibilité de l'inhibition par le sulfite. On a trouvé en effet, qu'il est possible de restaurer par un lavage 85 à 89 p. 100 de l'activité des bactéries inhibées.

#### DISCUSSION DES RESULTATS.

L'utilisation de molécules radioactives a déjà rendu des services dans l'étude des inhibitions. C'est ainsi que des expériences utilisant la radio-penicilline (18) ont permis de s'apercevoir, qu'il existe sur les bactéries des points de fixation de cet antibiotique.

En employant du sulfite radioactif, nous avons pu montrer que cet inhibiteur se fixe sur les corps bactériens et qu'il existe de grandes analogies entre cette fixation et l'action inhibitrice qui a déjà été mise en évidence.

La réversibilité a été démontrée dans les deux cas, où l'on a restauré par simple lavage 85 p. 100 de l'activité et libéré 85 p. 100 de l'acide sulfureux fixé.

Lorsqu'on considère l'influence du pH sur ces deux réactions, on constate aussi une action parallèle. Une diminution de pH augmente à la fois l'inhibition et la quantité d'acide sulfureux fixé par les corps bactériens. Jusqu'ici, l'action du pH n'a été étudiée que sur l'action bactéricide de l'acide sulfureux. Des différences considérables ont été observées pour de faibles changements de pH. CRUESS et IRISH (20) ont pensé que les propriétés antiseptiques des sulfites ne doivent être dues qu'à la forme moléculaire, aux ions bisulfites et à l'anhydride, et que les ions  $\text{SO}_3^-$  en sont dépourvus. RAHN et CONN (69) ont signalé une sensibilité différente chez les deux microorganismes qu'ils ont étudiés : *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. La multiplication d'*E. coli* est déjà inhibée par les ions  $\text{SO}_3\text{H}^-$ , alors que celle des levures n'est sensible qu'à la forme  $\text{SO}_3\text{H}_2$  non dissociée. Pour les levures, l'inhibition de la croissance se produit dans la zone pH 2,4 à 5 lorsque la concentration en forme non dissociée  $\text{SO}_3\text{H}_2$  est de 4 mg/l.

Lorsqu'on se rapporte au tableau XVII, on constate que pour des pH compris entre 3 et 3,8 le taux d'inhibition de 50 p. 100 est atteint lorsque le milieu contient entre 4,4 et 5,2  $\mu$  mol/l de  $\text{SO}_3\text{H}_2$ . Les concentrations en ions bisulfites, qui varient beaucoup dans ces limites de pH, ne paraissent pas avoir une influence sur l'inhibition. Or on voit d'après le graphique II, qu'aux environs de pH 3, la fixation de sulfite radioactif est à peu près proportionnelle à la concentration en molécules non dissociées. Au contraire, à pH 4,2, les ions bisulfites doivent contribuer à l'inhibition puisqu'on n'a plus que 2,76  $\mu$  mol/l de  $\text{SO}_3\text{H}_2$ . A ce pH la combinaison du sulfite avec les bactéries doit aussi faire intervenir les ions bisulfites. Il y a donc une grande analogie de comportement en fonction du pH, dans ces deux phénomènes. Il est important de souligner que pour une même concentration en acide sulfureux, la quantité fixée augmente de la même façon que le fait l'inhibition, lorsque le pH diminue. Ce fait nouveau nous permet déjà d'éliminer une explication du pouvoir inhibiteur qui reposait sur les propriétés réductrices des sulfites. WYSS (92) se référant à l'action des sulfites sur l'insuline et en particulier aux travaux de DU VIGNEAUD (62), propose l'explication suivante. Les protéines enzymatiques nécessiteraient la présence de certaines liaisons disulfures pour pouvoir fonctionner. Les sulfites ainsi que d'autres réducteurs, tels que l'hydrogène sulfuré, la cystéine, le glutathion, seraient capables de couper les liaisons disulfures en faisant apparaître des groupements thiols et produiraient ainsi l'inactivation. Cette façon de voir est en contradiction avec ce qu'on a constaté concernant l'influence du pH sur l'inhibition, la fixation de l'acide sulfureux et la réversibilité de la combinaison. Il est, en effet, établi par les travaux que nous avons déjà analysés, que les réactions de Clarke ont leur optimum autour de la neutralité. D'autre part, elles ne sont réversibles qu'en milieu neutre ou alcalin.

L'étude de l'équilibre existant entre l'acide sulfureux et les bactéries, laisse prévoir qu'on ne trouvera pas une bonne corrélation entre l'inhibition et l'une des formes de l'acide sulfureux. En effet, la combinaison de l'acide sulfureux sur les corps bactériens ne correspond vraisemblablement pas à une réaction chimique simple, puisqu'on n'a pas pu déterminer une constante d'équilibre. A côté de sa réaction sur le système enzymatique, il doit aussi se produire d'autres réactions qui ne concourent en rien à l'inhibition. Ces réactions parasites sont peu importantes lorsque la concentration en acide sulfureux reste faible puisqu'on a trouvé une bonne relation entre le sulfite à introduire et l'activité à inhiber. En revanche pour les fortes inhibitions et les pH élevés cette corrélation est moins nette, car ces réactions accessoires deviennent de plus en plus importantes.

---

## CHAPITRE V

### LA COMBINAISON DE L'ACIDE SULFUREUX AVEC LA CYSTÉINE

La fixation d'acide sulfureux sur les bactéries et l'inhibition qui lui est liée, doivent faire intervenir une réaction facilement réversible qui est d'autant plus complète que le pH est plus bas. C'est un modèle pour une telle réaction qui est décrit dans la troisième partie de ce travail.

Cette étude a eu pour point de départ, l'observation que nous avons faite, à savoir que l'acide sulfureux possède un spectre d'absorption dans l'ultra-violet, et que celui-ci se modifie par l'addition de composés à fonction sulfhydryle. Cette constatation laisse prévoir la formation d'un complexe, dont nous avons étudié les propriétés par spectrophotométrie. Au préalable, il a été nécessaire de préciser le spectre d'absorption des solutions diluées d'acide sulfureux en fonction du pH, puisque ces données faisaient défaut dans la littérature.

#### I. — Spectre de l'acide sulfureux.

##### a) Résultats antérieurs.

Les données concernant les spectres ultraviolets de l'acide sulfureux et de ses sels sont restées assez confuses, jusqu'à ces dernières années. Nous voyons à cela deux raisons, la première c'est que les résultats varient avec l'acidité des solutions, ce qui fait que les données expérimentales n'ont pu être interprétées tant que la notion de pH n'a pas été connue. La seconde, c'est la facilité avec laquelle il s'oxyde, diminuant la concentration présente au début de l'expérience et remplaçant un acide faible par un acide plus fort, qui abaisse le pH et modifie doublement les résultats.

Les solutions de sulfite neutre ne présentent pas de maximum d'absorption caractéristique. Tous les auteurs sont d'accord sur ce point: (10) (34) (91). BUCK et ses collaborateurs (10) notent simplement une absorption continue au-dessous de 280 m $\mu$ .

D'après GARRETT (34), les solutions aqueuses de sulfite acide de potassium présentent un maximum d'absorption à 276 m $\mu$  et un mini-

um à 233 m $\mu$ . Les valeurs de l'extinction moléculaire exprimées dans les unités suivantes

$$\epsilon = \frac{1}{c \cdot d} \log \frac{I_0}{I}$$

sont respectivement

$$\log \epsilon_{276} = 1,62 \text{ cm}^2 \text{ mol.}^{-1}$$

$$\log \epsilon_{233} = 0,21 \text{ cm}^2 \text{ mol.}^{-1}$$

VALYASHKO et CHESKO (85) donnent pour les solutions aqueuses de sulfite acide de sodium les valeurs suivantes :

$$\text{maximum } \log \epsilon_{273} = 1,204$$

$$\text{minimum } \log \epsilon_{233} = 0,690$$

Les résultats sont moins clairs en ce qui concerne l'anhydride sulfureux et ses solutions. Les maximum d'absorption sont les suivants d'après GARRETT (34)

$$\text{SO}_2 \text{ gazeux} \quad \text{à } 296 \text{ m}\mu$$

$$\text{SO}_2 \text{ liquéfié} \quad 285 \text{ m}\mu$$

$$\text{SO}_2 \text{ en solution aqueuse } 277 \text{ m}\mu$$

et la valeur des extinctions moléculaires à 276 m $\mu$

$$\text{pour SO}_2 \quad \log \epsilon = 2,16$$

$$\text{pour SO}_3\text{H}_2 \quad \log \epsilon = 2,34$$

Les recherches plus récentes de VALYASHKO et CHESKO (85) confirment la position de maximum à 290-287 m $\mu$  pour les solutions d'anhydride sulfureux dans le pentane ou dans l'eau, mais les coefficients d'extinction moléculaire sont beaucoup plus forts que ceux proposés jusqu'ici :

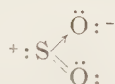
Dans le pentane

$$\text{au maximum } \log \epsilon_{290} = 3,806$$

$$\text{au minimum } \log \epsilon_{245} = 2,097$$

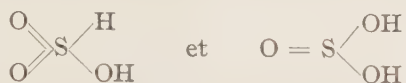
Dans l'eau, la position du maximum d'absorption ne change pas, mais le coefficient d'extinction moléculaire est 64 fois plus faible.

Une interprétation de ces résultats peut être donnée à partir des observations de LORENZ et SAMUEL (55), qui ont montré que l'absorption spécifique se retrouve chez les composés tétravalents du soufre. Or l'anhydride sulfureux dont la structure moléculaire peut être schématisée de la façon suivante :



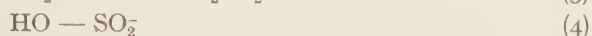
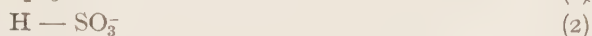
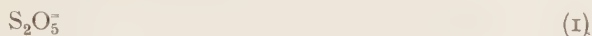
permettrait les oscillations électroniques responsables du spectre observé. En ce qui concerne le spectre de l'acide sulfureux, les travaux effectués

jusqu'ici ne permettent pas de dire s'il provient d'une absorption propre des formes tautomères que l'on admet généralement



ou bien d'une certaine quantité d'anhydride qui est toujours en équilibre avec l'acide dans les solutions.

Des renseignements supplémentaires sur la constitution ionique et moléculaire des solutions acides de sulfite ont été apportés par SIMON et WALDMANN (72) (73) au moyen du spectre Raman. En travaillant sur des solutions concentrées de pyrosulfite, ces auteurs ont pu mettre en évidence par leur fréquence Raman, les composés suivants.



Se trouvent ainsi confirmées, l'existence des deux formes tautomères (2) et (4) des ions métabisulfites bisulfites et la présence en solution d'anhydride ou plutôt d'anhydride hydraté.

#### b) Résultats personnels.

##### *Préparation des échantillons.*

Afin de se prémunir contre les erreurs que pourraient introduire des impuretés présentes dans les échantillons utilisés, nous avons préparé au laboratoire du sulfite de sodium et purifié un produit commercial.

Le sulfite de sodium a été préparé de la façon suivante. On constitue un générateur à anhydride sulfureux en faisant tomber goutte à goutte de l'acide sulfurique R. P. dans une solutions saturée et chaude de métabisulfite de potassium purifié « Prolabo ». Le gaz dégagé est lavé par barbotage dans une petite quantité d'eau. Après avoir purgé l'appareil de l'air qu'il contient, on fait barboter le gaz sulfureux dans une solution de soude R. P. à 10 p. 100. Après complète neutralisation, le sulfite de sodium est cristallisé dans l'eau à trois reprises, lavé à l'eau glacée et séché sous NaOH.

Du sulfite de sodium pur, cristallisé « Probalo » a subi trois cristallisations successives en vue de sa purification. L'eau utilisée dans ces opérations avait été fraîchement distillée dans un appareil de verre, afin d'éviter au maximum l'introduction de métaux lourds et de cuivre en particulier.

On a donc disposé de deux échantillons qui correspondent à l'hydrate  $\text{SO}_3\text{Na}_2, 7 \text{ H}_2\text{O}$  et contiennent un peu de sulfate qui ne s'est pas montré

généant, puisqu'il n'a pas de spectre propre. La normalisation des solutions a été faite par titrage à l'iode, dans les conditions déjà indiquées.

Ces deux échantillons ont peu de chance de contenir exactement les mêmes impuretés. Comme des solutions d'égale concentration en sulfite et amenées au même pH donnent des spectres identiques, nous en avons conclu que l'absorption observée dans l'ultra-violet est bien due à l'une des formes de l'acide sulfureux contenue dans la solution et non pas à des impuretés.

Une seconde preuve est fournie par l'expérience dont les résultats sont rapportés dans le tableau XXXII.

TABLEAU XXXII

*Absorption de solutions d'acide sulfureux partiellement oxydées.*

|                                                               | 1    | échantillon n° |       |      |       |
|---------------------------------------------------------------|------|----------------|-------|------|-------|
|                                                               |      | 2              | 3     | 4    | 5     |
| SO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> ajouté en $\mu$ mol /ml ..... | 4,48 | 4,48           | 4,48  | 2,24 | 1,12  |
| I ajouté en $\mu$ mol /ml.....                                | 0    | 4,48           | 6,72  | 0    | 0     |
| SO <sub>2</sub> restant après la réaction .....               | 4,48 | 2,24           | 1,12  | 2,24 | 1,12  |
| Densité optique à 275 m $\mu$ .....                           | 1,41 | 0,71           | 0,355 | 0,72 | 0,375 |

Toutes les solutions sont faites dans l'acide phosphorique 0,25 M.

Cuve quartz 1  $\times$  1 cm. Absorption mesurée par rapport à l'acide phosphorique 0,25 M.

Il apparaît que l'absorption dans l'ultra-violet diminue lorsque le sulfite est partiellement oxydé par l'iode et qu'elle ne dépend que de la quantité de sulfite restant dans le liquide. En particulier, lorsqu'on compare les échantillons 2 et 4, et 3 et 5, qui contiennent la même quantité d'acide sulfureux, on remarque qu'ils présentent des absorptions identiques aux erreurs de mesure près. Il n'en serait pas ainsi, si l'absorption était due à une impureté contenue dans la préparation de sulfite, car l'échantillon 4 par exemple a reçu deux fois moins de sulfite que le 2 et devrait donc présenter une absorption 2 fois plus forte.

Nous pensons que ces précautions et ces expériences doivent rendre absolument certaine l'existence d'un spectre d'absorption dans l'ultra-violet pour les solutions de sulfite en milieu acide.

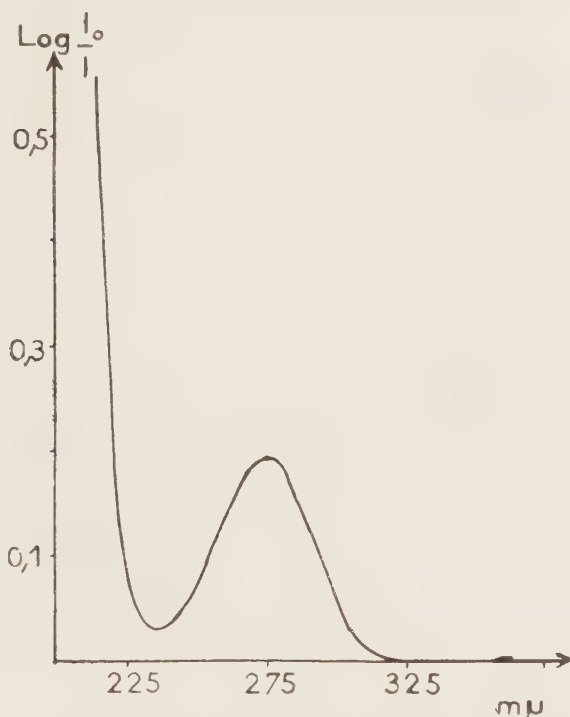
#### *Forme du spectre.*

Le spectre d'une solution acide de sulfite a été enregistré entre 220 et 375 m $\mu$ . Il est reproduit sur le graphique 12.

L'enregistrement montre une bande d'absorption centrée à 275 m $\mu$ . On n'a pas jugé nécessaire de calculer la constante moléculaire d'absorption à partir de ces résultats, car comme on le verra par la suite, elle varie avec le pH et ne présente donc pas d'intérêt. Les résultats contenus dans le tableau XXXII indiquent que l'absorption à 275 m $\mu$  suit la loi de Beer, lorsque le pH ne varie pas.

*Variation du spectre en fonction du pH.*

Nos mesures ont confirmé que le sulfite ne donne pas de bande d'absorption en milieu neutre. En revanche en milieu acide, on voit apparaître le maximum d'absorption à 275 m $\mu$ , quel que soit l'acide utilisé : acide citrique, phosphorique ou chlorhydrique. Ceci prouve que l'absorp-



GRAPHIQUE 12. — Spectre d'une solution acide de sulfite. Solution de sulfite de Na purifié 5  $\mu$  mol/m dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 2,70 après mélange dans une cuve de 1 cm d'épaisseur. Le témoin est réalisé avec le tampon au même pH et à la même dilution.

tion constatée n'est pas due à une combinaison avec les acides présents dans les tampons, mais doit être rapportée à une forme particulière de l'acide sulfureux.

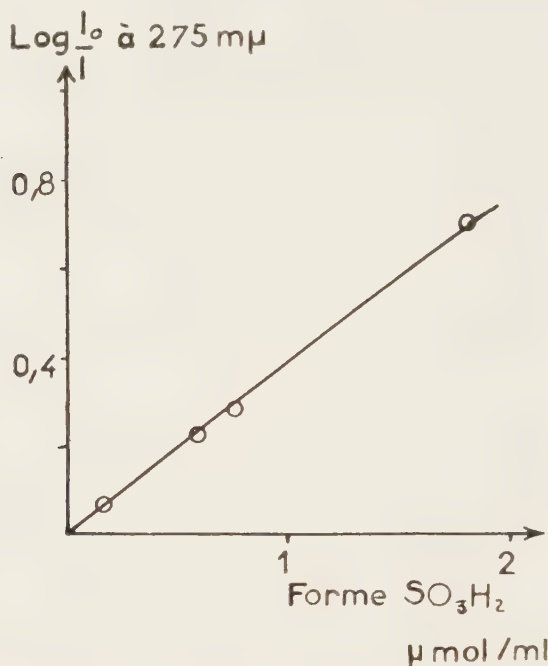
*Signification de l'absorption à 275 m $\mu$ .*

Nous avons vu que les sulfites en milieu acide peuvent exister au moins sous quatre formes différentes :

- 1° de SO<sub>2</sub> dissous et ses hydrates ;
- 2° de SO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> ;
- 3° de SO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> ;
- 4° de SO<sub>3</sub><sup>=</sup>.

On a donc recherché s'il n'est pas possible de faire correspondre les valeurs de l'absorption à la concentration en l'une de ces formes.

Le graphique 13, indique clairement, qu'il existe une relation de



GRAPHIQUE 13. — Relation entre l'absorption et la concentration en acide sulfureux non dissocié. Mêmes conditions que celles indiquées au tableau XXXIII.

TABEAU XXXIII

*Relation entre l'absorption à 275 mμ  
et la forme non dissociée de l'acide sulfureux.*

| pH   | $\log \frac{I_0}{I} \text{ 275}$ | % de forme $\text{SO}_3\text{H}_2$ | $\mu\text{mol/ml}$ de forme $\text{SO}_3\text{H}_2$ dans la solution |
|------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 2,02 | 0,702                            | 35,77                              | 1,79                                                                 |
| 2,52 | 0,277                            | 15,18                              | 0,759                                                                |
| 2,65 | 0,217                            | 11,67                              | 0,584                                                                |
| 3,21 | 0,0625                           | 3,48                               | 0,174                                                                |
| 4,07 | 0,010                            | 0,57                               | 0,0275                                                               |

Solution contenant 5  $\mu\text{mol/ml}$  de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$ , tampon phosphate de potassium acide phosphorique 0,15 M. Le pH des diverses solutions mesuré à l'électrode de verre, cuves de 1 cm d'épaisseur.

stricte proportionnalité entre l'absorption à 275 mμ et la forme  $\text{SO}_3\text{H}_2$  calculée à partir du pH et des constantes de dissociation de l'acide sulfureux (voir p. 55).

On peut donc à partir du graphique n° 13 déterminer le coefficient d'absorption moléculaire pour cet acide.

Pour une concentration en acide sulfureux non dissocié de  $1 \mu\text{mol/ml}$  on trouve une absorption  $\log \frac{I_0}{I} = 0,382$  pour  $1 \text{ cm}$  d'épaisseur. En tenant compte du coefficient de transformation en logarithmes népériens, on trouve comme coefficient d'absorption moléculaire.

$$\epsilon_{275} = 0,382 \times 1000 \times 2,302 = 881 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$$

D'après les indications données dans le travail de VALYASHKO et CHESHKO (85), le coefficient d'absorption moléculaire de l'anhydride sulfureux dans l'eau serait  $\epsilon_{285} = 100$  au maximum. La valeur dans le pentane est  $\epsilon_{290} = 64000$ . Le chiffre que nous trouvons en tenant compte de la dissociation du sulfite en milieu acide est compris entre les deux. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les solutions d'anhydride sulfureux contiennent différentes formes en équilibre : anhydride dissous et ses hydrates et les 2 formes tautomères de l'acide sulfureux. Certaines de ces formes doivent vraisemblablement être dépourvues de propriétés d'absorption, ce qui se manifeste par un  $\epsilon$  plus faible dans l'eau que dans le pentane où n'existe que la forme  $\text{SO}_2$ . Dans les calculs de dissociation en fonction du pH, ce que nous avons englobé sous la formule  $\text{SO}_3\text{H}_2$  n'est en réalité que la partie qui n'est pas  $\text{SO}_3\text{H}^-$  ou  $\text{SO}$ , peut être constitué par un mélange de formes. Le fait que l'absorption soit proportionnelle à la fraction  $\text{SO}_3\text{H}_2$  ne prouve pas qu'elle est en fait due aux molécules  $\text{SO}_3\text{H}_2$ , elle peut aussi être due en tout ou en partie, à d'autres molécules en équilibre avec  $\text{SO}_3\text{H}_2$ . Cependant, comme la loi de Beer Lambert est vérifiée en solution diluée, on doit admettre aussi que la dilution a peu d'influence sur l'équilibre des composés responsables de l'absorption.

## II. — Spectres de la cystine, de la cystéine et de l'acide cystéine S-sulfonique.

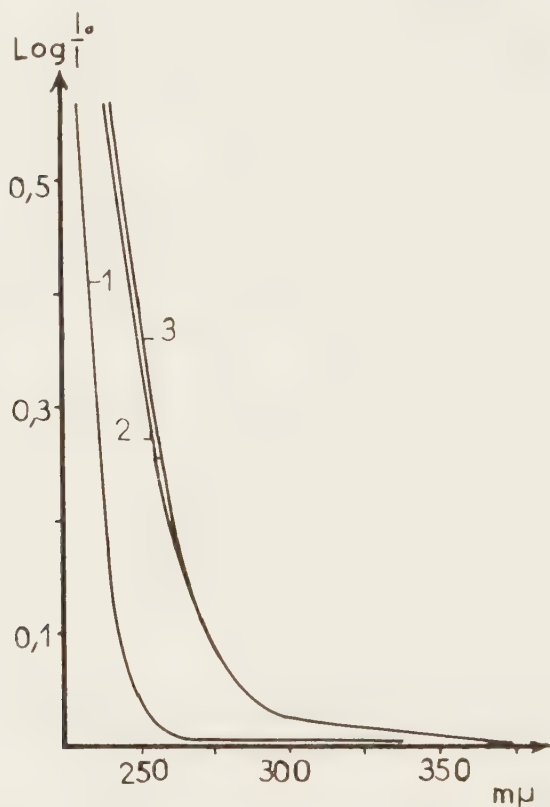
Les données concernant la cystine et la cystéine sont assez nombreuses et en général concordantes. Elles ont été passées en revue par BEAVEN et HOLIDAY (7), et nous nous contenterons de citer les résultats de FROMAGEOT et SCHNEK (33) qui doivent nous permettre par la suite d'interpréter nos propres mesures.

La cystéine ne présente pas de bande d'absorption caractéristique. D'après CALVIN (12) son absorption jusqu'à  $250 \text{ m}\mu$  est négligeable en milieu chlorhydrique  $0,1$  ou même  $12 \text{ N}$ . On n'aura pratiquement pas à en tenir compte dans nos expériences.

L'absorption générale de la cystine est plus importante. Elle se manifeste déjà à  $300 \text{ m}\mu$  et présente un faible maximum à  $240 \text{ m}\mu$ . Le maximum n'est nettement perceptible qu'en milieu alcalin. En milieu acide, on ne perçoit qu'un épaulement à cette longueur d'onde.

Dans nos expériences, nous avons utilisé le chlorhydrate de cystéine « Roche ». Les solutions ont été faites 0,02 M par pesées et amenées au pH désiré. On n'a utilisé que des solutions fraîchement préparées. On a aussi vérifié que le titrage à l'iode était en accord avec la pesée.

L'acide cystéine S-sulfonique est le composé qui apparaît lorsque le sulfite réagit sur la cystine. Nous n'avons trouvé aucune indication



GRAPHIQUE 14. — Spectre d'absorption.

1. cystéine 0,008 M dans  $\text{PO}_4\text{H}_3$  0,02 M
  2. cystéine S-sulfonate de  $\text{NH}_4$  0,0077 M dans  $\text{PO}_4\text{H}_3$  0,016 M.
  3. cystéine S-sulfonate de  $\text{NH}_4$  0,0077 M dans  $\text{NaOH}$  0,016 M.
- Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoins  $\text{PO}_4\text{H}_3$  ou  $\text{NaOH}$  à la même dilution.

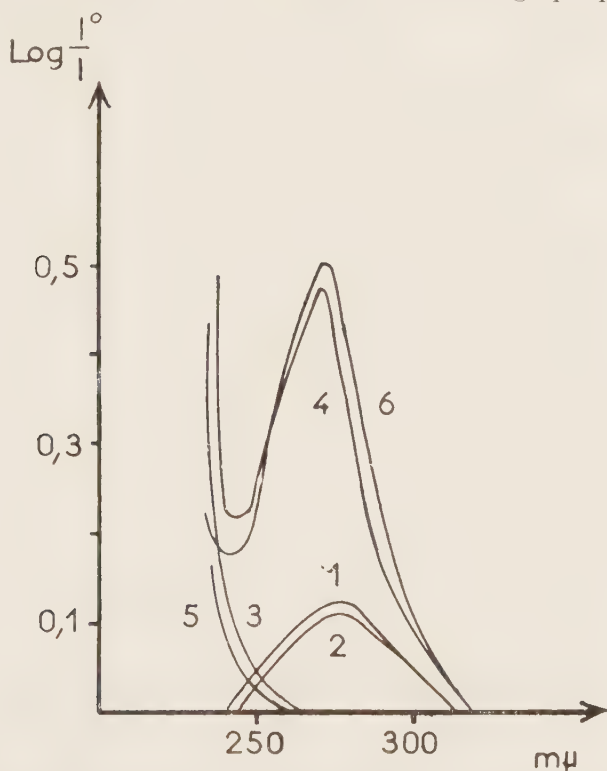
concernant son spectre d'absorption. Or ce produit est susceptible de se former dans nos expériences, car l'on n'est jamais sûr que les solutions de cystéine que l'on utilise ne contiennent pas de faibles quantités de cystine, qui prennent naissance par oxydation.

En suivant la technique indiquée par CLARKE (16), on a préparé un échantillon cristallisé de cystéine S-sulfonate d'ammonium. Le spectre ultra-violet de ce produit a été déterminé en milieu acide et en milieu basique et tracé sur le graphique 14.

Il est dépourvu de bande d'absorption caractéristique et ressemble en cela à celui de la cystine. Il n'est cependant pas possible de percevoir à 250 m $\mu$  l'épaule que l'on attribue généralement à l'existence d'une liaison disulfure, qui ne doit pourtant pas faire défaut dans ce composé.

### III. — Spectre de la combinaison cystéine-acide sulfureux.

Le mélange d'une solution de cystéine avec une solution de sulfite acide ou d'acide sulfureux produit une modification importante du spectre ultra-violet, comme le met en évidence le graphique 15.



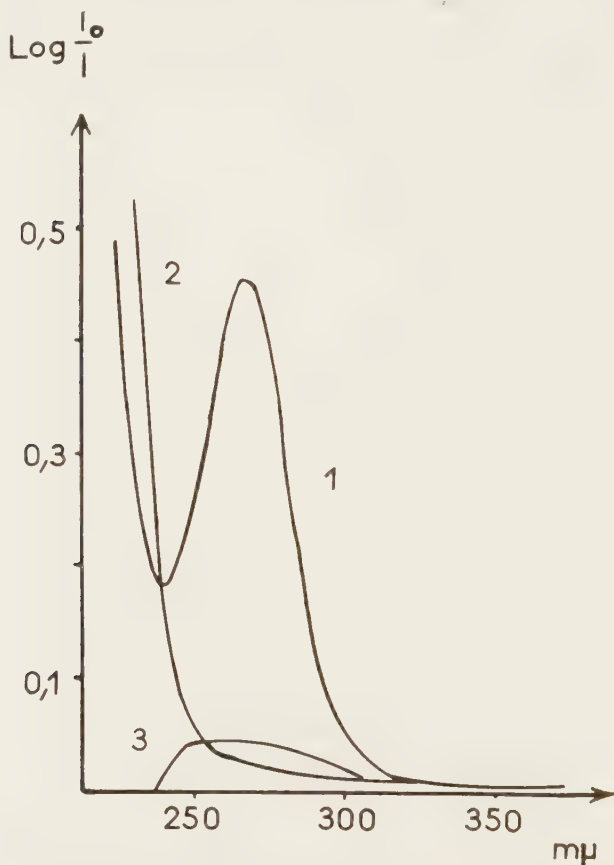
GRAPHIQUE 15. — Spectre d'absorption dans le tampon Mc Ilvaine 0,026 M pH 2,6.

1. sulfite de sodium 0,0033 M. — 2. sulfite de sodium + Glycocolle 0,0033 M. — 4. sulfite de sodium + Glutathion 0,0033 M. — 6. sulfite de sodium + Cystéine 0,0033 M. — 3. glutathion 0,0033 M. — 5. Cystéine 0,0033 M. — Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin tampon à la même dilution.

On en a déduit qu'il doit se former un complexe responsable de cette absorption. La même modification se retrouve lorsque la cystéine est remplacée par le glutathion réduit. Au contraire aucun changement n'est observé lorsqu'on mélange le sulfite à une solution saturée, acide, de cystine ou d'un autre acide aminé tel que le glycocolle.

Ces observations nous ont amené à admettre l'existence d'une combinaison de l'acide sulfureux avec les fonctions thiols.

Dans les expériences qui vont suivre, la cystéine a été choisie comme modèle de corps contenant une fonction thiol. Elle offre sur le glutathion l'avantage d'avoir un spectre beaucoup plus simple, puisqu'il lui est impossible de former comme ce dernier en milieu acide un noyau thiazoline, qui donne justement une bande d'absorption entre 260 et 270  $m\mu$ , qui risque de se confondre avec celle due à la réaction du sulfite. Le graphique 16



GRAPHIQUE 16. — Spectre d'absorption dans le tampon Mc Ilvaine pH 3, concentration en  $P O_4 H_3$  0,008 M. — 1 cystéine 0,004 M + sulfite 0,004 M. — 2 cystéine 0,008 M. — 3. sulfite 0,08 M. — Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin tampon à la même dilution.

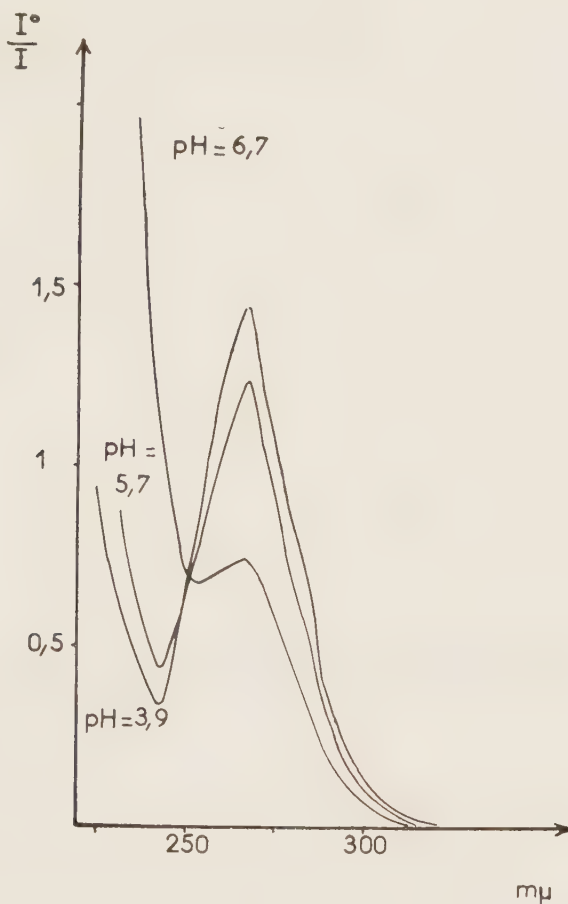
reproduit trois spectres : celui de la cystéine (2), celui de l'acide sulfureux (3) et celui obtenu en mélangeant ces deux solutions (1).

Les diverses solutions ont été faites dans un même tampon pH 3 et les absorptions déterminées par rapport à ce tampon.

Le spectre du mélange ne peut être déduit de l'addition des spectres de chacun des composants. Son maximum à 267  $m\mu$  est légèrement déplacé par rapport à celui de l'acide sulfureux, 275  $m\mu$ . D'autre part son intensité est augmentée d'environ 10 fois.

## a) Influence du pH.

L'influence du pH a été étudiée en mélangeant les mêmes solutions dans des tampons différents. Le graphique 17 indique que le maximum se maintient à 267 m $\mu$  lorsque le pH varie de 3,9 à 6,7.



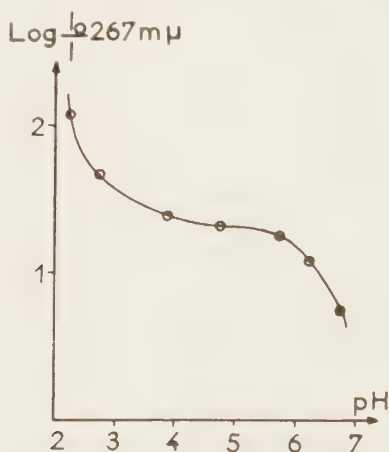
GRAPHIQUE 17. — Spectre d'un mélange cystéine-sulfite à divers pH. Cystéine 0,016 M. Sulfite 0,016 M. Mélange phosphate disodique acide phosphorique 0,1 M. pH mesuré à l'électrode de verre. Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin mélange à la même dilution.

Il montre aussi l'existence d'un point isobestique, ce qui indique que la solution comporte deux composés absorbants en équilibre.

La courbe des absorptions maximum à 267 m $\mu$  en fonction du pH, reproduite sur le graphique 18, montre qu'autour de pH 5, l'absorption varie peu avec le pH.

b) Étude de la combinaison  
par la méthode des variations continues.

La facilité avec laquelle il est possible de suivre la réaction par spectrophotométrie, nous a incité à utiliser la méthode des variations continues pour obtenir des renseignements supplémentaires et quantitatifs sur cette combinaison. La méthode introduite par JOB (46), consiste à mélanger dans un milieu à concentration ionique constante les deux corps entrant en réaction dans une proportion telle que la somme des concentrations de sulfite et de cystéine, reste constante d'un échantillon à l'autre.



GRAPHIQUE 18. — Absorption d'un mélange sulfite-cystéine en fonction du pH.  
Cystéine 0,016 M. Sulfite 0,016 M. Mélange de phosphate disodique et d'acide phosphorique 0,1 M. pH mesuré à l'électrode de verre. Cuve de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin mélange à la même dilution.

L'absorption des solutions est ensuite mesurée à 267 mμ qui correspond au maximum d'absorption du nouveau composé.

Les deux courbes du graphique 19 montrent que dans la zone des pH utilisés (1,4 à 5,7), la combinaison se fait molécule à molécule, puisque le maximum d'absorption est atteint lorsque la concentration en cystéine égale celle en acide sulfureux.

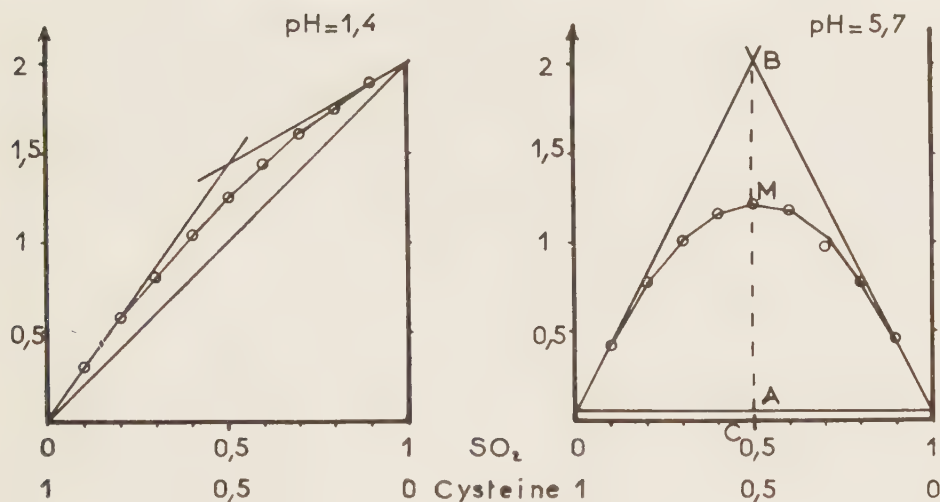
Les tangentes aux points  $[\text{SO}_2] = 0$  et  $[\text{cystéine}] = 0$  représentent la variation de la densité optique si la combinaison était totale, alors que la droite qui joint les points  $[\text{SO}_2] = 0$  et  $[\text{cystéine}] = 0$  représente les variations de la densité optique s'il n'y avait pas de combinaison. La comparaison de la courbe expérimentale à ces deux limites permet de déterminer la dissociation de la combinaison.

A la concentration équivalente, MA est proportionnel à la quantité de complexe non dissocié, alors que MB est proportionnel à la quantité dissociée.

Il est donc possible de déterminer à partir du graphique le coefficient de dissociation  $\alpha$ , c'est-à-dire le rapport entre le nombre de molécules dissociées et le nombre total de molécules qui existeraient si le complexe était parfait.

$$\alpha = \frac{MA}{MA + MB}$$

$\text{Log } \frac{I_0}{I} \text{ 267 m}\mu$



GRAPHIQUE 19. — Méthode des variations continues appliquée à des solutions de cystéine et de sulfite.

1° Dans l'acide phosphorique 0,2 M, concentration cystéine + sulfite 0,008 M. pH 1,4 mesuré à l'électrode de verre.

2° Dans du tampon phosphate 0,12 M, pH 5,7, concentration cystéine + sulfite 0,016 M.

Mesures faites dans des cuves de 1 cm d'épaisseur. Comme témoin le tampon ou l'acide à la même dilution.

On a au point C, où les concentrations des deux constituants sont égales :

$$(\text{ac. sulfureux}) = (\text{cystéine}) = (\text{complexe dissocié}).$$

D'autre part, la concentration qu'atteindrait le complexe, s'il n'était pas dissocié, est égale à  $c$ , concentration des deux constituants au point C. On a donc,

$$\begin{aligned} (\text{ac. sulfureux}) &= (\text{cystéine}) = (\text{complexe dissocié}) = \alpha c \\ (\text{complexe non dissocié}) &= (1 - \alpha) c. \end{aligned}$$

D'où la constante d'équilibre de la réaction suivante :



$$K = \frac{\alpha c \times \alpha c}{(1 - \alpha) c} = \frac{\alpha^2}{(1 - \alpha)} c.$$

Les déterminations ont été faites suivant cette méthode à quatre pH différents et les résultats obtenus sont les suivants :

|        |            |
|--------|------------|
| pH 1,4 | K = 0,0011 |
| pH 2,7 | K = 0,0013 |
| pH 4,0 | K = 0,0017 |
| pH 5,7 | K = 0,0022 |

#### c) Réversibilité de la réaction.

En milieu acide, la réaction de la cystéine sur l'acide sulfureux se fait avec une grande rapidité à la température ambiante. La densité optique a déjà atteint son maximum, 30 secondes après le mélange, au moment où l'on peut commencer les mesures. La réaction est facilement réversible. Ainsi, on constate que les dilutions de mélanges équimoléculaires d'acide sulfureux et de cystéine ne suivent pas la loi de BEER-LAMBERT. La réaction inverse est aussi très rapide.

### IV. — Spectre différentiel des bactéries en présence de sulfite

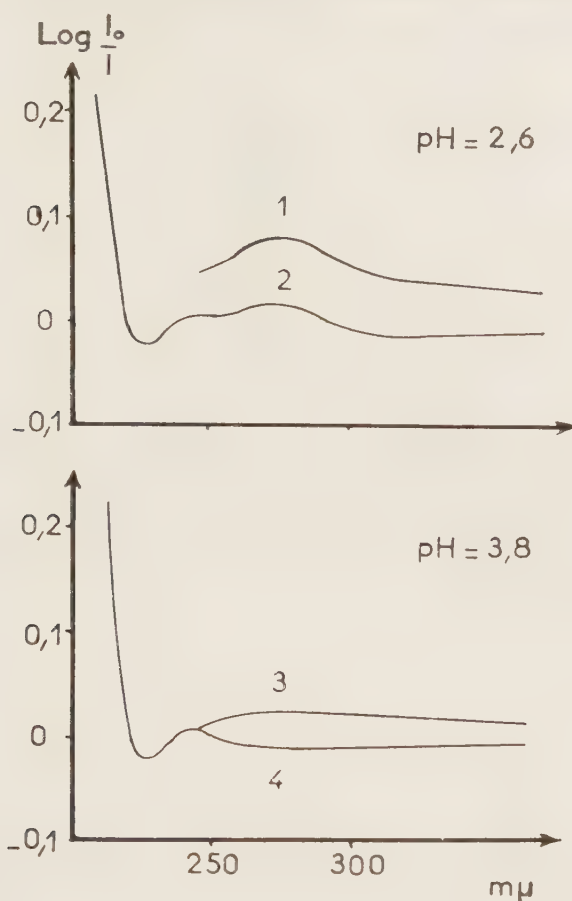
On a cherché à voir si les bactéries mises en incubation en présence de sulfite, en milieu acide, présentaient les mêmes modifications de spectre, que celles observées lors de la combinaison sulfite-cystéine.

Il faut prévoir, qu'il sera particulièrement délicat de mettre en évidence des modifications spectrales dans une zone où le spectre est considérablement obscurci par l'absorption des protéines. Les mesures ne peuvent être faites qu'avec un spectrophotomètre à double rayon permettant de travailler en milieu trouble. On a été obligé de travailler avec une suspension bactérienne et un tampon très dilués, de façon à permettre la transmission d'une énergie suffisante pour que la fente d'entrée de l'appareil reste dans des limites acceptables pour son bon fonctionnement. Malgré cela, nous n'attribuons aux courbes du graphique 20 qu'une valeur qualitative. Elles montrent, que l'addition de bactéries à des solutions d'acide sulfureux augmente l'absorption vers 270  $\mu$ , et cela d'autant plus que le milieu est plus acide.

### DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Les expériences qui viennent d'être décrites démontrent bien, qu'il existe en milieu acide, une combinaison entre l'acide sulfureux et les composés possédant une fonction thiol. L'instabilité de ce complexe ne permet pas de l'isoler du milieu dans lequel il se forme. C'est ainsi, que

la chromatographie sur papier de solutions contenant le complexe, n'a jamais fourni que des taches de sulfite et de cystéine. La structure chimique de ce corps sera donc difficile à préciser, puisque nous n'avons



Graphique 20. — Spectre différentiel des bactéries avec et sans sulfite.

A pH 2,6. Tampon Mc Ilvaine, concentration en  $\text{PO}_4$  0,002 M.

Bactéries 0,17 mg/ml. Sulfite 2  $\mu$  mol/ml.

1. Spectre de différence bactéries + sulfite par rapport aux bactéries seules.

2. Spectre de différence tampon + sulfite par rapport au tampon seul.

A pH 3,8. Tampon Mc Ilvaine, concentration en  $\text{PO}_4$  0,007 M.

3. comme 1

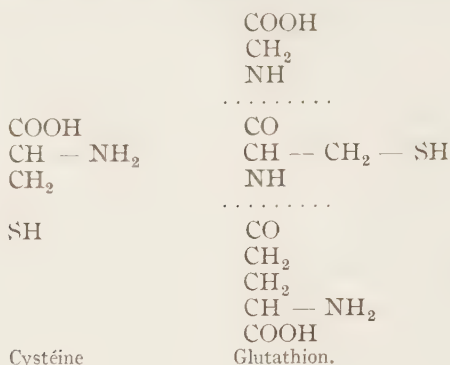
4. comme 2

Mesures faites dans des cuves de 1 cm d'épaisseur.

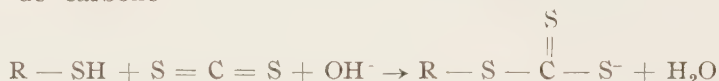
pu utiliser aucune des méthodes chimiques de l'analyse fonctionnelle. On en sera donc réduit à des conjectures et à rechercher une explication vraisemblable aux propriétés que nous avons observées.

Le fait que les solutions de glutathion et de cystéine, en présence d'acide sulfureux et au même pH, conduisent à des résultats identiques au point de vue position du maximum d'absorption et coefficient d'absorp-

tion moléculaire, nous indique que seule la fonction thiol doit intervenir dans la réaction.

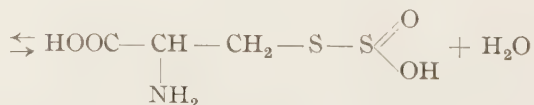
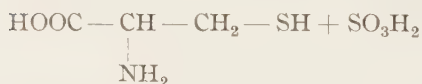


En effet, dans le glutathion, ni la fonction amine, ni la fonction acide de la cystéine ne peuvent réagir, puisqu'elles sont engagées toutes deux dans des liaisons peptidiques. On a aussi constaté que le glycolle qui comporte ces deux fonctions libres, ne donne pas de spectre caractéristique en présence d'acide sulfureux. Or, si l'on se rapporte à ce que nous savons de la chimie des mercaptans et en particulier de ceux ayant une importance en chimie biologique, il faut admettre qu'ils sont très réactifs. BARLTROP, HAYES et CALVIN (5) signalent leur réaction sur le sulfure de carbone



qui se produit en milieu légèrement alcalin et conduit à un alkyl-trithio-carbonate. La réaction est complète et instantanée. Elle est mise en évidence par l'apparition de maximum d'absorption à 300 et 335 mμ. La formation de ce composé est réversible. D'après CALVIN (12), une réaction analogue se produirait vraisemblablement avec CO<sub>2</sub>, elle conduirait à la formation de S-alkyl monothiocarbonate, stable en milieu alcalin et libérant CO<sub>2</sub> en milieu acide. A notre connaissance, cette hypothèse n'a pas encore donné lieu à des travaux expérimentaux.

Avec l'acide sulfureux, on peut prévoir la formation d'un thiolester. Dans le cas de la cystéine on aurait la réaction suivante :



Cette réaction est analogue à celle qui a été utilisée par WIELAND et KÖPPE (90) pour la synthèse du lactoylglutathion par exemple.

Les thiolesters décrits par STADTMAN (79) possèdent aussi une absorption particulière vers 230-240  $m\mu$ , due à la liaison R-CO-S-R, qui est stable en milieu neutre ou légèrement alcalin, mais qui disparaît ou est fortement atténuée par une hydrolyse acide. Les propriétés spectrales que nous avons décrites dans la partie expérimentale diffèrent de celles des alkyl-thiolesters.

La structure proposée pour le produit d'addition de l'acide sulfureux sur la cystéine comporte une molécule tétravalente de soufre, à laquelle on peut attribuer l'absorption spécifique dans l'ultraviolet, ce qui est en parfait accord avec les observations générales de LORENZ et SAMUEL (55), qui ont montré que les composés tétravalents du soufre sont les seuls à présenter une absorption dans l'ultraviolet.

L'instabilité du produit formé est tout à fait analogue à celle que présentent les divers esters de l'acide sulfureux. C'est ainsi que le sulfite d'éthyle préparé par ARBUSOW (4) se détruit rapidement en milieu aqueux. Le sulfite de glycol est aussi instable, mais sa décomposition est plus lente, surtout en milieu neutre. Des esters sulfureux vraiment stables ne sont signalés par PECHUKAS (66) qu'avec des corps tels que le glycidol (2-3 epoxy I-propanol). La réversibilité se retrouve aussi bien dans la réaction des thiols sur l'acide sulfureux que dans celle sur le sulfure de carbone.

Nous avons donc là des arguments qui permettent de penser que le produit de la réaction de l'acide sulfureux sur la cystéine est bien un thiolester de l'acide sulfureux.

## CONCLUSION

### EXPLICATION DU MODE D'ACTION DE L'ACIDE SULFUREUX EN TANT QU'INHIBITEUR

Nous avons pu montrer que l'acide sulfureux est un inhibiteur de l'oxydation de l'éthanol par *A. rancens*. C'est là un résultat nouveau puisque jusqu'ici on avait surtout signalé son action bactéricide sur les microorganismes. L'inhibition se fait en milieu acide et paraît ne faire intervenir que les formes  $\text{SO}_3\text{H}_2$  et  $\text{SO}_3\text{H}^-$ , l'acide sulfureux étant beaucoup plus actif que les ions bisulfites. Elle est réversible dans une large mesure si l'incubation n'a pas été trop prolongée et la dose trop importante.

Pour expliquer son action, plusieurs propriétés de l'acide sulfureux ou de ses dérivés ont été avancées. Au terme de cette étude, nous allons passer successivement en revue ces hypothèses et rechercher dans quelle mesure elles sont susceptibles de rendre compte des observations que nous avons rapportées.

### Propriétés réductrices.

JOSLYN et BRAVERMANN (48) considèrent en 1954 que le mode d'action de l'acide sulfureux en tant qu'agent de conservation est inconnu. Ils croient qu'il pourrait découler de ses propriétés réductrices, susceptibles d'abaisser la tension d'oxygène à un point incompatible avec la croissance des organismes aérobies ou susceptibles de maintenir à l'état réduit un système enzymatique indispensable à la croissance. Par leur pouvoir réducteur, les sulfites peuvent en effet, s'opposer à certains phénomènes biologiques. C'est ainsi qu'ils inhibent l'oxydation du catéchol comme l'ont montré BRANCH et JOSLYN (8). DOWNER (23) a aussi montré qu'ils empêchent l'oxydation de l'acide ascorbique présent dans les végétaux. Il est donc tentant d'expliquer leur action sur les microorganismes, en imaginant qu'ils réduisent entièrement certains composés intermédiaires, bloquant ainsi le mécanisme normal des oxydo-réductions. Nous avons trouvé que des substances fortement réductrices, comme l'acide ascorbique, la cystéine sont sans effet sur la réaction étudiée. D'autre part les propriétés réductrices des sulfites existent aussi bien en milieu neutre qu'en milieu acide, ce qui ne rend pas compte du fait que l'inhibition ne se produit qu'en milieu acide. On a aussi montré que l'augmentation de la tension d'oxygène ne modifie pas le taux de l'inhibition. Pour toutes ces raisons il semble qu'un mode d'action faisant intervenir les propriétés réductrices ne puisse être retenu dans ce cas.

### Modification de la perméabilité des membranes.

L'acide sulfureux augmente la perméabilité des membranes. C'est une constatation déjà ancienne que l'on a faite sur les cellules végétales et qui a même donné lieu à des applications pratiques, par exemple pour extraire le sucre des cossettes de betterave. Au cours de notre travail, nous n'avons jamais constaté un tel phénomène avec les *Acetobacter*. L'autolyse a été recherchée en dosant l'azote susceptible de diffuser dans le milieu au cours de l'incubation mais nous n'avons jamais pu la mettre en évidence.

### Propriétés acides.

WYSS (92) applique à l'acide sulfureux une théorie déjà utilisée pour expliquer la différence de toxicité de l'ion et de la molécule du même corps. La membrane externe des bactéries ayant une structure lipidoprotéique, seules peuvent la franchir les molécules solubles dans les lipides. Or il se trouve, que les formes ionisées des acides habituellement utilisés comme inhibiteurs, sont insolubles dans les graisses alors que leurs molécules sont facilement solubles. Cette théorie, bien qu'elle n'explique pas le mode d'action de l'acide sulfureux, rend compte du fait qu'il n'est inhibiteur

qu'en milieu acide. Quoique cette explication ne soit pas à rejeter en général, elle ne peut s'appliquer à ce cas particulier. En effet, l'inhibition se produit dans les mêmes conditions si on utilise les bactéries ou les extraits dépourvus de cellules qui en dérivent. Elle n'est donc pas sous la dépendance de la perméabilité de la membrane, puisqu'elle n'existe plus dans les extraits.

### Combinaison avec les aldéhydes.

On a longtemps cru que la découverte, par NEUBERG, de la fermentation déviée pouvait expliquer l'action inhibitrice de l'acide sulfureux. Dans le cas particulier des bactéries acétiques, la fermentation acétique serait bloquée parce que l'éthanal se transforme en éthane  $\alpha$  hydroxy-sulfonate, que les bactéries ne peuvent plus oxyder. Comme on l'a vu, cet acide est dépourvu de toxicité pour les *Acetobacter* et il n'est donc pas possible d'expliquer par sa formation une inhibition totale. Dans la fermentation déviée de NEUBERG, seule une partie du phénomène, la transformation de l'éthanal en acide acétique, est inhibée. Si la réaction est suivie en mesurant l'absorption d'oxygène, on doit donc la trouver diminuée de moitié en présence de sulfite et l'inhibition doit cesser lorsque tout le sulfite est combiné.

Nos expériences montrent qu'il n'en est rien : l'inhibition peut être totale et l'acide éthane  $\alpha$  hydroxysulfonique ne s'accumule pas dans le milieu sous l'action des bactéries inhibées.

### Combinaison avec le DPN.

Depuis les travaux de PFLEIDERER, JECKEL et WIELAND (67) (68), on connaît l'action inhibitrice du sulfite sur les deshydrogenases à diphosphopyridine nucléotide. D'après ces auteurs, l'extrême sensibilité présentée par les deshydrogénases des acides malique et lactique, deux enzymes clefs du métabolisme intermédiaire, est susceptible de donner une explication aux propriétés désinfectantes bien connues de l'acide sulfureux. Nous avons donc examiné si la découverte de ces auteurs était susceptible de rendre compte du processus d'inhibition que nous avons décrit pour *Acetobacter*. L'inhibition des deshydrogénases se produit déjà à pH 7,2 et on ne mentionne pas une influence du pH. Pour les *Acetobacter* au contraire, le phénomène est presque nul à pH 7 et très exalté lorsque le pH diminue. L'acide sélénieux inhibe la respiration des *Acetobacter* à peu près dans les mêmes conditions que l'acide sulfureux alors qu'il est sans action sur la deshydrogénase de l'acide lactique. D'après les résultats de ces auteurs, les deshydrogénases sensibles à l'acide iodacétique ne sont pas sensibles au sulfite. Or on retrouve exactement le contraire pour *Acetobacter* qui est sensible à 2 mg/l d'esters de

l'acide monobromacétique, dont l'action est analogue à celle de l'acide monoiodacétique (35). Dans le cas de la déshydrogénase de l'acide lactique ces auteurs ont montré que le sulfite est un inhibiteur compétitif du lactate, alors que nos résultats montrent que pour *Acetobacter* il agit comme un inhibiteur absolu. Lorsqu'on met en incubation enzyme, coenzyme et sulfite, on voit apparaître une augmentation de l'absorption à 320 m $\mu$  en milieu neutre. Si la même chose s'était passée avec les *Acetobacter*, on aurait pu la déceler dans les spectres différentiels obtenus entre les bactéries incubées avec sulfite et sans sulfite. Nos résultats expérimentaux prouvent qu'il n'en est rien et que l'augmentation d'absorption ne se produit qu'en milieu acide et à 275 m $\mu$ . Ces deux inhibitions n'ont en commun qu'une seule propriété, c'est celle d'avoir une action réversible.

Toutes les différences que nous venons de relever montrent que le sulfite n'a pas le même comportement dans les deux cas.

### Combinaison avec les fonctions thiols.

Après avoir passé en revue les diverses explications proposées pour rendre compte de l'action inhibitrice du sulfite, nous constatons qu'aucune d'elles n'est satisfaisante pour interpréter les résultats que nous avons obtenus avec *Acetobacter*. Au terme de cette étude, il nous paraît utile d'en proposer une nouvelle.

On remarque tout d'abord que les trois phénomènes qui ont été étudiés dans la partie expérimentale de ce travail :

inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol,

fixation de l'acide sulfureux sur les corps bactériens,

combinaison de l'acide sulfureux avec les corps à fonction thiol, présentent des analogies frappantes.

En premier lieu nous avons montré qu'il s'agit là de réactions réversibles. L'inhibition cesse dans une proportion de 80 p. 100 lorsqu'on lave les bactéries ou qu'on relève le pH du milieu. L'acide sulfureux fixé sur les bactéries se comporte de la même façon. Quant à la combinaison avec la cystéine, elle est entièrement réversible. Le fait que la réversibilité ne soit pas totale avec les bactéries peut être interprété en admettant qu'une partie de l'acide sulfureux participe à une réaction différente de celle que nous avons décrite avec la cystéine.

En second lieu, le pH a la même influence sur ces réactions. L'inhibition étudiée augmente régulièrement lorsque le pH diminue et il en est de même de l'acide sulfureux fixé sur les bactéries. Nous avons vu que ces deux phénomènes ne sont proportionnels ni aux molécules  $\text{SO}_3\text{H}_2$  ni aux ions  $\text{SO}_3\text{H}^-$ . Il semble plutôt que les ions bisulfites et les molécules y prennent part inégalement, les molécules réagissant plus

facilement que les ions. La combinaison avec la cystéine est aussi d'autant plus complète que le pH est plus bas.

Nous avons montré qu'une certaine quantité de sulfite peut se fixer sur les bactéries inactives, et elle varie peu avec le pH. Au contraire les bactéries ayant une activité enzymatique importante fixent beaucoup plus de sulfite en milieu acide qu'en milieu neutre. Cette constatation indique que l'intégrité du système enzymatique responsable de l'oxydation de l'éthanol est indispensable pour permettre la fixation du sulfite aux pH bas. Les résultats obtenus avec des extraits enzymatiques étant identiques à ceux obtenus avec des bactéries, on en a conclu que l'inhibition n'est pas liée à une question de perméabilité de membrane qui varierait avec le pH. Dans l'étude de l'inhibition, nous avons aussi observé que la quantité de sulfite à utiliser pour obtenir un résultat donné est à peu près proportionnelle à l'activité que l'on veut inhiber. Toutes ces raisons nous ont amené à penser que la fixation du sulfite se fait sur les molécules de protéines enzymatiques non altérées présentes dans les bactéries.

Or nous avons pu démontrer que le sulfite réagit en milieu acide sur les fonctions thiols pour donner un composé, qui à notre connaissance n'a pas été décrit jusqu'à ce jour et que nous avons des raisons de considérer comme un thiol ester de l'acide sulfureux. De nombreux travaux sur les enzymes et plus spécialement ceux de BARRON et LEVINE (6) sur la deshydrogénase de l'éthanol, ont mis en évidence l'importance de certains groupes thiols qui sont indispensables à la fixation de la coenzyme comme à celle du substrat. L'inhibition peut donc s'expliquer par le blocage des fonctions thiols présentes sur les protéines enzymatiques, qui se produit à la suite de leur estérification par l'acide sulfureux. Cette explication de l'inhibition par les sulfites, qui ne paraît pas avoir déjà été proposée, nous semble être celle qui s'applique le mieux au cas particulier que nous avons étudié.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) ALEXANDER (P.) et HUDSON (R.). — *Wool its chemistry and physics*. Reinhold Pub. Corp., New York, 1954.
- (2) ANON. — General results in the investigations showing the effect of sulphurous acid and sulphites upon digestion and health. *U. S. Dep. Agr. Bur. Chem. Circ.*, **37**, 1-18, 1907.
- (3) ANSON (M. L.). — Protein denaturation and the properties of protein groups. *Advances in Protein Chem.*, **2**, 361-86, 1945.
- (4) ARBUSOW (A. E.). — Sur les éthers de l'acide sulfureux. *Bull. Soc. Chim.*, **8**, 890-891, 1910.
- (5) BARLTROP (J. A.), HAYES (P. M.) et CALVIN (M.). — The chemistry of 1-2 dithiolane (triméthylène disulfide) as a model for the primary quantum

- conversion act in photosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4348-4367, 1954.
- (6) BARRON (F. G. S.) et LEVINE (S.). — Oxidation of alcohols by yeast alcohol dehydrogenase and by the living cell. The Thiol groups of the Enzyme *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 175-187, 1952.
  - (7) BEAVEN (G.) et HOLIDAY (E.). — Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Advances in Protein Chem.*, **7**, 320-386, 1952.
  - (8) BRANCH (G. E.) et JOSLYN (M. A.). — The kinetics of the auto-oxidation of catechol in the presence of several foreign substances. *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2388-2394, 1935.
  - (9) BUCHNER (E.) et MEISENHIMER (J.). — Enzyme bei Spaltpilzgärungen. *Ber.*, **36**, 622-624, 1903.
  - (10) BUCK (R. P.), SAMANG SINGHADEJA et ROGER (L. B.). — Ultra-violet absorption spectra of some inorganic ions in aqueous solution. *Anal. Chem.*, **26**, 1240, 1954.
  - (11) BUNTE (H.). — Ueber äthylaldehydschwefigsäure Salze und die Einwirkung des Schwefigsäuren Natrons auf Aethylidenchlorür. *Ann. Chem.*, **170**, 306-330, 1873.
  - (12) CALVIN (M.). — Mercaptans and disulfides : some physics, chemistry, and speculation. *Glutathione*, Academic Press New York, 3-26, 1954.
  - (13) CECIL (R.) et LØENING (U. E.). — The reaction of the disulphide bonds of insulin with sodium sulphite. *Biochem. J.*, **66**, 181, 1957.
  - (14) CECIL (R.) et Mc PHEE (J. R.). — A kinetic study of the reaction on some disulphides with sodium sulphite. *Biochem. J.*, **60**, 496-506, 1955.
  - (15) CHARLOT (G.) et GAUGUIN (R.). — Analyse des réactions en solution. Masson et Cie. Paris, p. 39, 1951.
  - (16) CLARKE (H. T.). — Sulfité action on cystine. *J. Biol. Chem.*, **97**, 235-250, 1932.
  - (17) COLOWICK (S.), KAPLAN (N.), CIOTTI (M.). — The reaction of pyridine nucleotide with cyanide and its analytical use. *J. Biol. Chem.*, **191**, 447-459, 1951.
  - (18) COOPER (P. D.). — Site of action of radiopenicillin. *Bacteriol. Rev.*, **20**, 28-46, 1956.
  - (19) CORDEBAR (J.). — L'oxydation chromique en analyse quantitative. *Ste Impr. Typogr.* Nancy, 1942.
  - (20) CRUESS (W. V.) and IRISH (J. H.). — Further observations on the relation of pH to toxicity of preservatives to micro organisms. *J. Bacteriol.*, **23**, 163-166, 1932.
  - (21) DEIBNER (L.). — Particularités du dosage iodométrique de petites quantités d'anhydride sulfureux. *Ann. Techn. Agr.*, **3**, 207-242, 1953.
  - (22) DOGSON (K. S.), SPENCER (B.) et THOMAS (J.). — Studies on sulphotases. *Biochem. J.* **53**, 452-7, 1953.
  - (23) DOWNER (A.). — The stability of ascorbic acid in citrus fruit juice products. *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 80-82, 1942.
  - (24) DUPUY (P.). — Les facteurs du développement de l'acescence dans le vin. *C. R. Ac. Agr. de France.*, **41**, 269-72, 1954.
  - (25) ELSWORTH (F.) et PHILLIPS (H.). — The action of sulphites on the cystine disulfide linkages in wool. The influence of pH values on the reaction. *Biochem. J.* **32**, 837-843, 1938.
  - (26) ELSWORTH (F.) et PHILLIPS (H.). — The action of sulphites on the cystine disulfide linkages in wool. The influence of temperature, time and concentration on the reaction. *Biochem. J.*, **35**, 135-143, 1941.
  - (27) FRAENKEL-CONRAT (H.). — The essential groups of lysozyme with particular reference to its reaction with iodine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **27**, 109, 1950.
  - (28) FRANZL (R.) et CHARGAFF (E.). — Bacterial enzyme preparations oxidizing inositol and their inhibition by colchicine. *Nature*, **168**, 955-957, 1951.

- (29) FRATEUR (J.). — Essai sur la systématique des *Acetobacter*. *La cellule*, **53**, 287-392, 1950.
- (30) FREEDMANN (G.) et DONALD (G. M. S.). — Fermentation processes leading to glycerol. Studies on the effect of sulfites on viability, growth and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Bact.*, **5**, 211-216, 1957.
- (31) FROMAGEOT (P.) et CHAPEVILLE (F.). — Incorporation du sulfite dans l'animal supérieur. *La Biochimie du Soufre*, Éditions du C. N. R. S. Paris, 171-181, 1956.
- (32) FROMAGEOT (C.) et HEITZ (P.). — Méthode de dosage spécifique de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique. *Microchim. Acta.*, **3**, 52-67, 1938.
- (33) FROMAGEOT (C.) et SCHNEK (G.). — Le spectre ultra-violet du lysozyme avec des considérations sur le spectre ultra-violet de divers acides aminés et de quelques-uns de leurs peptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, **6**, 113-122, 1950.
- (34) GARRETT (C. S.). — Extinction measurements of solutions of sulphurous acid, sulphites, hydrogen sulphites and metabisulfites and of gaseous and liquid sulphur dioxide. *J. Chem. Soc.*, **107**, 1324, 1915.
- (35) GILDO DAL CIN. — I derivati alogenati dell' acido acetico in enotecnica. *Riv. Viti. e Enol. (Conegliano)*, **3**, 357, 1950.
- (36) GOMORI (G.). — Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, **1**, 138, 1955.
- (37) GRANT (M.). — Colorimetric determination of sulfur dioxide. *Anal. Chem.*, **19**, 3456, 1947.
- (38) HANDLER (P.) et FRIDOVICH (I.). — Les dernières étapes de l'oxydation de la cystéine : l'oxydation du sulfite. *Biochimie du soufre*, Édition du C. N. R. S. Paris, 83-98, 1956.
- (39) HASS (E.). — Notiz über das Verhalten der Absorption Spektren der Dihydro-pyridinverbindungen. *Biochem. Z.*, **288**, 123, 1936.
- (40) HESTRIN (S.). — Fermentation of disaccharides. II. Sucrose. *Wallerstein Lab. Comm.*, **12**, 45-53, 1949.
- (40 bis) HROMATKA (O.). — Méthodes de recherches sur la fermentation avec la technique « cultures submergées ». *Cong. Int. du Vinaigre*, La Haye, 1957, communication n° 14.
- (41) HROMATKA (O.) et EBNER (H.). — Untersuchungen über die Essiggärung. I. Fesselgärung und Durchlüftungsverfahren. *Enzymologia*, **13**, 369-387, 1949.
- (42) HROMATKA (O.), EBNER (H.) et CSOKLICH (C.). — Untersuchungen über die Essiggärung. IV. Über den Einfluss einer vollständigen Unterbrechung der Belüftung auf die submerse Gärung. *Enzymologia.*, **15**, 134-153, 1951.
- (43) INGRAM (M.) et VAS (K.). — Combination of sulphur dioxide with concentrated orange juice. I. Equilibrium states. *J. Sci. Food Agr.*, **1**, 21, 1950.
- (44) JACOBSON (K.) et AZEVIDO (D.). — Étude sur la fermentation tartrique. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1823-1825, 1955.
- (45) JAULMES (P.). — Analyses des vins. Poulain Montpellier, 1951.
- (46) JOB (P.). — Formation et stabilité des complexes minéraux en solution. *Ann. de Chim.*, **9**, 113, 1928.
- (47) JOSLYN (M.). — Color retention in fruit products. *Ind. Eng. Chem.*, **33**, 308-314, 1941.
- (48) JOSLYN (M. A.) et BRAVERMAN (J. B. S.). — Sulfur dioxide treatment of fruit and vegetable products. *Advances in Food Research*, **5**, 97-160, 1954.
- (49) KERP (W.). — Die schwefelige Saure und ihre Verbindungen mit Aldehyden und Ketonen. *Arb. Ges. Aml.*, **21**, 175, 1904.
- (50) KING (T.) et CHELDELIN (V.). — Oxidations in *Acetobacter suboxydans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 108-116, 1954.

- (51) KING (T.) et CHELDELIN (V.). — Oxidation of aceteldehyde by *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.*, **220**, 177-191, 1956.
- (52) KOLTHOFF (I. M.) et STRICKS (W.). — II. Reactions in ammoniacal medium in the presence and absence of sulfite. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1728-1733, 1951.
- (53) LANGMUIR (I.). — The absorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, **40**, 1361-1403, 1918.
- (54) LINEWEAVER (H.) et BURCK (D.). — The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 658-666, 1934.
- (55) LORENZ (L.) et SAMUEL (R.). — Über die Absorptions Spektren von Schwefelverbindungen. *Z. phys. Chem. B.*, **14**, 219-231, 1931.
- (56) LUBOCHINSKY (B.) et ZALTA (J. P.). — Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 1363-1366, 1954.
- (57) MAC PHEE (J. R.). — Further studies on the reaction of disulphides with sodium sulfite. *Biochem. J.*, **64**, 22-29, 1956.
- (58) MEYERHOF (O.) OHLMEYER (P.) et MOHLE (W.). — Über die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei die anaeroben Kohlenhydratspaltung. *Biochem. Z.*, **297**, 113-134, 1938.
- (59) MICHEEL (F.) et BODE (G.). — Zur Kenntnis der Schlangengifte. VI. Mitteil. *Ber.*, **71**, 1302-303, 1938.
- (60) MICHEEL (F.) et BODE (G.). — Zur Kenntnis der Schlangengifte. VIII. Mitt. *Ber.*, **71**, 2653-2658, 1938.
- (61) MICHEEL (F.) et EMDE (H.). — Zur Kenntnis der Schlangengifte. *Z. f. physiol. Chem.*, **265**, 266-275, 1940.
- (62) MILLER (G. L.) et DU VIGNEAUD (V.). — The cystine content of insulin. *J. Biol. Chem.*, **118**, 101-110, 1937.
- (63) NEUBERG (C.) et NORD (F.). — Festlegung der Aldehydstufe bei der Essiggärung. *Biochem. Z.*, **96**, 158-174, 1919.
- (64) NEUBERG (C.) et REINFURTH (E.). — Die Festlegung der Aldehydstufe bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.*, **89**, 365-414, 1918.
- (65) PEARSON (P. B.). — Utilisation du soufre minéral par les animaux supérieurs pour la synthèse de molécules organiques. *La biochimie du Soufre*, Éditions du C. N. R. S. Paris, 153-170, 1956.
- (66) PECHUKAS (A.). — Sulfite esters. *Chem. Abstracts.*, **49**, 7588, 1955.
- (67) PFLEIDERER (G.), JECKEL (D.) et WIELAND (T.). — Über die Einwirkung von Sulfat auf einige DPN hydrierende Enzyme. *Biochem. Z.*, **328**, 187-194, 1956.
- (68) PFLEIDERER (G.), JECKEL (D.) et WIELAND (T.). — Zum Wirkungsmechanismus der Milchsäure dehydrogenase. *Biochem. Z.*, **329**, 104-111, 1957.
- (69) RAHN (O.) et CONN (J.). — Effect of increase in acidity on antiseptic efficiency. *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 185-187, 1944.
- (70) ROTHENBACH (F.) et EBERLIN (L.). — Zu der Enzymgärung der Essigpilze. *Deutsche Essigindustrie Wochenschrift.*, **9**, 233, 1905.
- (70 bis) SCARDOVI (V.). — Azione del solfito sull' attivazione enzimatica dell' acido acetico in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. di Microbiol.* **7**, 30-7, 1956.
- (71) SEIFERT (W.). — Über die Einwirkung einiger antiseptisch Stoffe auf verschiedene Mikroorganismen des Weines. *Oesterreichische chemiker Zeitung*, **1**, 381-3, 1898.
- (72) SIMON (A.) et WALDMANN (K.). — Über die Konstitution der sauren Sulfite. I. Wässrige Disulfite — (Pyrosulfite) — Lösungen und ihr Verhalten in Abhängigkeit von Konzentration und Alkalisierungsgad. *Z. für. anor. all. Chem.* **281**, 113-134, 1955.
- (73) SIMON (A.) et WALDMANN (K.). — Über die Konstitution der sauren Sulfite. II. Die Gleichgewichte der sauren Sulfite in wässrigen Lösungen auf Grund der Ramen-Spektren der in Wasser und in Methanol gelösten

- sowie der Kristallisierten Alkalisalze. *Z. für anor. all. Chem.*, **281**, 135-150, 1955.
- (74) SKEGGS (H. R.) and WRIGHT (L. D.). — Use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21-26, 1944.
- (75) SLOTTA (K. H.), FORSTER (W.), LUDWIG (H.), et CONRAT (F.). — Über die schwefelhaltigen Bausteine des Cobra-Giftes. *Ber.*, **71**, 1623-1625, 1938.
- (76) SMITH (L.). — Bacterial cytochromes. *Bact. Rev.*, **18**, 106-130, 1954.
- (77) SORBO (B.). — *Biochimie du soufre*, Édition du C. N. R. S., Paris, p. 96, 1956.
- (78) SPEAKMAN (P. T.). — The mechanism of the reaction between cystine in keratin and sulphite-bisulphite solutions at 50°C. *Biochim. Biophys. Acta.*, **25**, 347-355, 1957 et **28**, 284-93, 1958.
- (79) STADTMAN (E. R.). — Préparation and assay of acyl coenzyme A and other thiol esters. *Methods in enzymology*, Academic Press New-York, **3**, 931-941, 1957.
- (80) STRICKS (W.) et KOLTHOFF (I. M.). — Equilibrium constants of the reaction of sulfite with cystine and with dithiodiglycolic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4569-4574, 1951.
- (81) STRICKS (W.), KOLTHOFF (I. M.) et KAPOOR (R. C.). — Equilibrium constants of the reaction between sulfite and oxydized glutathione. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2057-2061, 1955.
- (82) TARTAR (H. V.) et GARRETSON (H. H.). — The thermodynamic ionization constants of sulfurous acid at 25° *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 808, 1941.
- (83) TERAYAMA (H.) et VESTLING (C.). — Sodium sulfide inhibition of liver lactic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **20**, 586-587, 1956.
- (84) UNDERKOFER (L. A.). — Industrial fermentations. *Chem. Pub. Corp.* New York, p. 257, 1954.
- (85) VALYASHKO (N.) et CHESHKO (F.). — Spectrographic study in the ultra-violet of sulfur dioxide and sulfurous acid methane sulfonic acids and their derivatives. *Sbornik. Statei. Obshcher. Kim. Akad. Nauk. SSSR.*, **1**, 572-583, 1953.
- (86) WALLENFELS (K.) et SCHULY (H.). — Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinucleotiden. VI. Die chemische Natur des Saureproduktes hydrierter Pyrimidium verbindungen und ein Vorschlag für einen Mechanismus der enzymatischen Reduktion von Brenztraubensäure und Phosphoglycerin säure. *Biochem. Z.*, **329**, 75-82, 1957.
- (87) WALLERSTEIN (J. S.) et STERN (K. G.). — Bisulfite as an inhibitor of carboxylase and the mechanism of glycerol fermentation. *J. Biol. Chem.*, **158**, 1-17, 1945.
- (88) WARBURG (O.) et CHRISTIAN (W.). — Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1941.
- (89) WIELAND (H.) et BERTHO (A.). — Über den Mechanismus der Oxydations Vorgänge. *Ann. Chem.*, **467**, 95-158, 1928.
- (90) WIELAND (T.) et KOPPE (H.). — Synthesen einiger weiterer S-Acylverbindungen insbesondere des Glutathions. *Ann. Chem.*, **588**, 15-24, 1954.
- (91) WRIGHT (R.). — The absorption spectra of sulphurous acid and sulfites. *J. Chem. Soc.*, **105**, 2907, 1914.
- (92) WYSS (O.). — Microbial inhibition by food preservatives. *Advance in Food Research*, **1**, 373-393, 1948.
- (93) ZELITCH (I.). —  $\alpha$ -hydroxysulfonate as inhibitors of the enzymatic oxydation of glycolic and lactic acids. *J. Biol. Chem.*, **224**, 251-260, 1957.



## TABLE DES MATIÈRES

### Introduction.

### CHAPITRE PREMIER

#### TRAVAUX ANTÉRIEURS CONCERNANT CERTAINES RÉACTIONS DE L'ACIDE SULFUREUX

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| I. — Réaction de l'acide sulfureux sur les liaisons disulfures .....      | 16 |
| II. — Réaction de l'acide sulfureux sur les protides.....                 | 18 |
| a) l'insuline .....                                                       | 18 |
| b) le venin de serpent.....                                               | 19 |
| c) la laine .....                                                         | 20 |
| III. — Inhibition des réactions enzymatiques par l'acide sulfureux..      | 21 |
| a) fermentations déviées .....                                            | 21 |
| b) formation d'un sulfonate .....                                         | 23 |
| c) combinaison de sulfite avec le diphosphopyridine nucléo-<br>tide ..... | 24 |

### CHAPITRE II

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| A. — Techniques bactériologiques.....                                 | 28 |
| I. — Description de la souche bactérienne .....                       | 28 |
| a) caractères morphologiques des colonies.....                        | 28 |
| b) caractères microscopiques .....                                    | 29 |
| c) caractères biochimiques.....                                       | 29 |
| II. — Conditions de culture .....                                     | 30 |
| a) milieu de culture.....                                             | 30 |
| b) réalisation de l'aérobiose .....                                   | 32 |
| c) préparation de la suspension de bactéries non proliférantes        | 32 |
| d) préparation d'un extrait enzymatique.....                          | 33 |
| B. — Techniques chimiques .....                                       | 35 |
| a) dosage de sulfite .....                                            | 35 |
| — méthode iodométrique,                                               |    |
| — méthode colorimétrique,                                             |    |
| — oxydation du sulfite pendant les opérations de centri-<br>fugation. |    |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| b) dosage de l'éthanal .....       | 39 |
| c) dosage de l'acide acétique..... | 40 |
| d) dosage de l'éthanol .....       | 40 |
| e) dosage de l'azote.....          | 40 |
| f) appareillage.....               | 40 |

### CHAPITRE III

#### ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ÉTHANOL ET DE SON INHIBITION PAR LE SULFITE

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. — Oxydation de l'éthanol .....</b>                                                  | <b>41</b> |
| a) choix d'un tampon .....                                                                | 41        |
| b) action du pH et de la concentration en éthanol.....                                    | 43        |
| <b>II. — Inhibition de l'oxydation de l'éthanol par l'acide sulfureux....</b>             | <b>45</b> |
| a) oxydation du sulfite au cours des expériences .....                                    | 45        |
| b) avantage d'une incubation en présence d'acide sulfureux                                | 47        |
| c) conditions de l'incubation.....                                                        | 48        |
| d) bilan de l'oxydation de l'éthanol en absence et en présence<br>d'acide sulfureux ..... | 49        |
| e) inhibition par l'acide sulfureux.....                                                  | 51        |
| — inhibition de l'oxydation de divers substrats,                                          |           |
| — influence du pH,                                                                        |           |
| — réversibilité de l'inhibition,                                                          |           |
| — nature de l'inhibition.                                                                 |           |
| Discussion des résultats .....                                                            | 60        |

### CHAPITRE IV

#### FIXATION DE L'ACIDE SULFUREUX SUR LES BACTÉRIES

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. — Techniques .....</b>                                                | <b>62</b> |
| a) purification du sulfite radioactif.....                                  | 62        |
| b) mesure de la radioactivité.....                                          | 63        |
| <b>II. — Fixation de l'acide sulfureux sur les bactéries.....</b>           | <b>64</b> |
| a) cas des bactéries traitées à l'iode ou inactivées par chauffage          | 66        |
| b) variation de l'acide sulfureux fixé en fonction du pH....                | 68        |
| c) variation de l'acide sulfureux en fonction de la concen-<br>tration..... | 69        |
| d) recherche de la fixation du sulfate.....                                 | 71        |
| <b>III. — Réversibilité de la fixation de l'acide sulfureux.....</b>        | <b>72</b> |
| Discussion des résultats.....                                               | 72        |

### CHAPITRE V

#### COMBINAISON DE L'ACIDE SULFUREUX AVEC LA CYSTÉINE

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. — Spectre de l'acide sulfureux .....</b> | <b>75</b> |
| a) résultats antérieurs .....                  | 75        |
| b) résultats personnels.....                   | 77        |
| — préparation des échantillons,                |           |
| — forme du spectre,                            |           |

- variation du spectre en fonction du pH,
- signification de l'absorption à 275 m $\mu$ .

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>II. — Spectre de la cystine et de la cystéine et de l'acide cysteine S-sulfonique.....</b> | <b>81</b> |
| <b>III. — Spectre de la combinaison cystéine-acide sulfureux.....</b>                         | <b>83</b> |
| a) influence du pH.....                                                                       | 85        |
| b) étude de la combinaison par la méthode des variations continues.....                       | 86        |
| c) réversibilité de la réaction.....                                                          | 88        |
| <b>IV. — Spectre différentiel des bactéries en présence du sulfite.....</b>                   | <b>88</b> |
| Discussion des résultats.....                                                                 | 88        |

## CONCLUSION

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Explication du mode d'action de l'acide sulfureux en tant qu'inhibiteur</b> | <b>91</b> |
| Propriétés réductrices.....                                                    | 92        |
| Modification de la perméabilité des membranes.....                             | 92        |
| Propriétés acides.....                                                         | 92        |
| Combinaison avec les aldéhydes.....                                            | 93        |
| Combinaison avec le Diphosphopyridine nucléotide.....                          | 93        |
| Combinaison avec les fonctions thiols.....                                     | 94        |

## DEUXIÈME THÈSE

---

**Propositions données par la Faculté :**

## MÉTABOLISME DE L'ACIDE TARTRIQUE

---

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 17 juin 1959

*Le Doyen de la Faculté des Sciences,*

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

*Le Recteur de l'Académie de Paris,*

Jean SARRAILH.



